Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Philipps - Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. C.G. Schirren)

Untersuchungen zur Atmung und anaeroben Glykolyse der Meerschweinchen - Epidermis in vitro und deren Veränderung unter der Wirkung einiger Zytostatika

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Gerhard Blonski

aus Lötzen

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Philipps - Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. C.G. Schirren)

Untersuchungen zur Atmung und anaeroben Glykolyse der Meerschweinchen - Epidermis in vitro und deren Veränderung unter der Wirkung einiger Zytostatika

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Gerhard Blonski

aus Lötzen

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 13. 11. 1969

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson
Referent: Priv. Doz. Dr. Dr. K. Salfeld
Correferent: Prof. Dr. med. W. Schmid

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

T h e m a :

Untersuchungen zur Atmung und anaeroben Glykolyse der Meerschweinchen - Epidermis in vitro und deren Veränderung unter der Wirkung einiger Zytostatika

G l i e d e r u n g :

	Seite
I. E i n l e i t u n g (Der Energiestoffwechsel der Zelle mit besonderer Berücksichtigung des Hautorgans. Das manometrische Verfahren in der Dermatologie. Themenstellung und Vorbemerkungen.)	1
II. V e r s u c h s a n l a g e , - m a t e r i a l u n d M e t h o d i k	13
A Versuchsanordnung	13
B Versuchsmaterial	15
C Statistische Auswertung	17
III. E r g e b n i s s e	18
A Vorversuche	18
1. Epidermisvorbereitung	18
2. Suspensionsmedien für Homogenate und Schnitte bei den Atmungsversuchen und die Wirkung der Zusätze: Glucose, Antibiotika, ATP, Phytohämagglutinin	20
3. Die anaerobe Glykolyse der Meerschweinchen-Epidermis (Suspensionsmedien und Zusätze)	30
B Wirkung verschiedener Zytostatika auf den O_2-Verbrauch der Meerschweinchen-Epidermis	34
1. Allgemeines	34
2. Methotrexat	35
3. Vincristin	38
4. Trenimon	42

Seite

IV. Diskussion 45

(Zusammenstellung der Ergebnisse früherer Untersuchungen zur Hautatmung und -glykolyse mit Hilfe des manometrischen Verfahrens und Vergleich mit unseren Resultaten mit besonderen Hinweisen auf die Bedeutung von Methodik und technischer Durchführung bei den Versuchen.
Einfluß der Zytostatika auf den Energiestoffwechsel.)

V. Zusammenfassung 56

VI. Literaturnachweis 58

I. E I N L E I T U N G

Eine zentrale Stellung im Stoffwechselgeschehen der Zelle nimmt der Energiestoffwechsel ein. Darunter werden Reaktionsfolgen verstanden, bei denen durch stufenweise Dehydrierung von Substraten neben Wärme chemische Energie in Form von energiereichen Phosphatverbindungen gewonnen wird. So entsteht bei der Übertragung von anorganischem Phosphat auf Adenosindiphosphat ATP, die Energiequelle der weitaus meisten biochemischen Reaktionen. Energie bedarf die Zelle als thermodynamisch labiles System, um Leben aufrechtzuerhalten. Fortwährend muß Arbeit verschiedener Art, z.B. in Form von chemischen Synthesen, Aufrechterhaltung von Konzentrationsgefällen und Substanztransport in Vehikelmechanismen geleistet werden (GILBERT[22]).

Die Gewinnung der Energie ist an das Vermögen der Zelle zu Atmung und Glykolyse gebunden. Unter Atmung versteht man den oxydativen Abbau von organischer Substanz zu Wasser und Kohlendioxyd unter Sauerstoffverbrauch. Dabei nimmt der Zitronensäurezyklus eine zentrale Stellung ein. Hier werden die niedermolekularen Abbauprodukte der Nahrungsstoffe eingeschleust. Die Kohlenhydrate durchlaufen die Glykolyse, eine Reaktionsfolge, die von über 20 verschiednen Enzymen katalysiert wird. Sie werden als Hexosen phosphorylisiert, zu Triosen gespalten und münden unter aeroben Verhältnissen über die Brenztraubensäure als aktivierte Essigsäure in den Zitronensäurezyklus ein. Ein Nebenweg im Kohlenhydratabbau, der Pentosephosphatzyklus, scheint für die Energiegewinnung nur geringere Bedeutung zu haben. Die Fette werden in Glycerin, das über Triosephosphat Anschluß an den Kohlenhydratabbau findet, und Fettsäuren gespalten. Letztere werden der ß-Oxydation unterworfen und bilden als Endprodukt wiederum Acetyl-Coenzym A oder - bei seltener ungerader Kohlenstoffzahl - Bernsteinsäure.

Die Aminosäuren, Bausteine der Proteine, werden auf sehr unterschiedliche Art abgebaut. Auch hier enden die Abbauprodukte nach oxydativer Decarboxylierung oder Transaminierung entweder

direkt oder teilweise über die Glycolyse im Zitronensäurezyklus. Andere Stoffe wie Nucleinsäuren oder Lipoide, die in der Nahrung in relativ kleiner Menge vorkommen und nur sehr geringen Anteil an der gesamten Energieproduktion gewinnen, werden letztlich ebenfalls in Acetyl-Coenzym A oder Zwischenprodukte des Zitronensäurezyklus überführt.

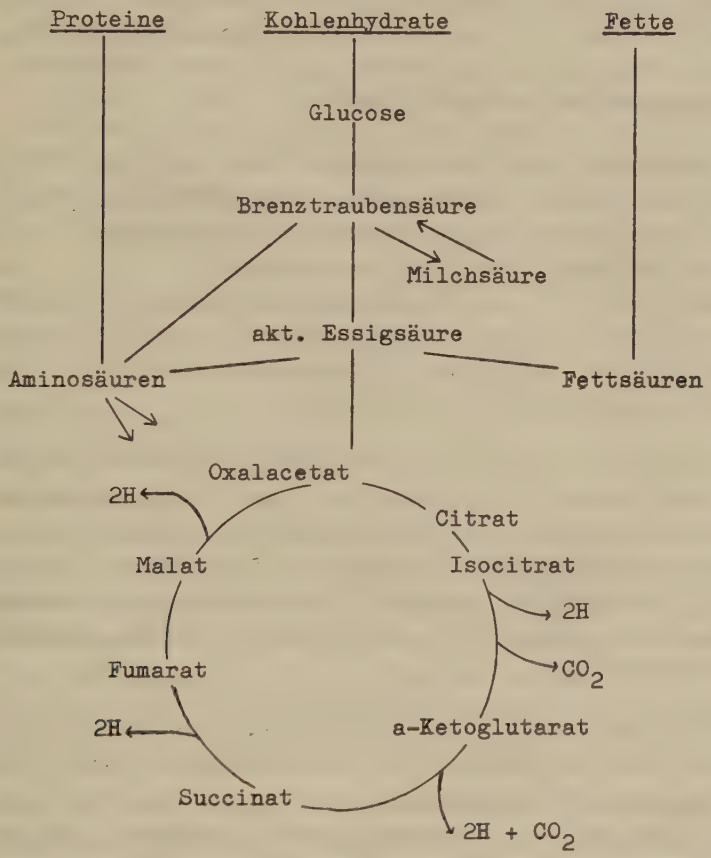
Im Zitronensäurezyklus erfolgt die fermentative Dehydrierung der Substrate. So wird Acetyl-Coenzym A in acht Oxydationsschritten vollständig zu H_2O und CO_2 oxydiert. Die abgespaltenen Wasserstoffatome können mit dem Sauerstoff über das komplizierte Fermentsystem der Atmungskette, eine Folge von spezifischen Dehydrogenasen, Flavoenzymen und Cytochromen, reagieren. Dieses ist der Vorgang, der die eigentliche "biologische Oxydation" ausmacht und mit Energieproduktion verbunden ist, die in Phosphatverbindungen gespeichert wird (Oxydative Phosphorylierung).

Anders muß die Energieentwicklung ablaufen, wenn Sauerstoff nicht zur Verfügung steht. Dann wird in der anaeroben Glykolyse die Glucose über Brenztraubensäure zu Milchsäure abgebaut. Eigenart mancher Gewebe ist, wie zum Beispiel der Tumoren (WARBURG[62]), daß sie auch unter aeroben Bedingungen eine verstärkte Milchsäuregärung aufzeigen.

Der Energiegewinn bei der Milchsäuregärung ist relativ gering. Pro Molekül Glucose werden hier lediglich 45 Kcal frei, während bei totaler Oxydation 686 Kcal an freier Energie geschaffen werden.

Eine schematisierte und vereinfachte Übersicht soll den Abbau und die Nutzbarmachung der Nahrungsstoffe und Zellbausteine auf dem Wege der Atmung oder Glykolyse noch einmal zusammenfassen und verdeutlichen:

Der intermediäre Energiestoffwechsel
(mod.nach GRIESEMER u.M.[25] und STÜTTGEN[56])



Atmungskette: $2H^+ + O^{--}$ ← O_2

oxydative Phosphorylierung → H_2O

Die umfassende Bedeutung der Energiegewinnung im Stoffwechselgeschehen der Zelle läßt Atmung und Glykolyse als relativ leicht meßbare Größen zu Indikatoren für Zellzustand und -funktion werden. Die weitaus meisten intrazellulären Reaktionen gewinnen über Substrat oder Enzym Anschluß an die o. a. Mechanismen, und jeder Eingriff und jede Abweichung von der physiologischen Reaktionsnorm sowohl in quantitativer wie in qualitativer Hinsicht müßten letztlich in einer Veränderung der Atmungsgrößen zum Ausdruck kommen.

Der Energiestoffwechsel mit Atmung und Glykolyse läuft als ein für alle Zellen notwendiger Vorgang unabhängig von Organ oder Spezies nach den im wesentlichen gleichen Richtlinien ab, wie sie oben kurz skizziert wurden (v. GLASENAPP u.M.[23]). Auch eine lokale Ordnung bleibt stets gewahrt. Die Mitochondrien sind die Stätte der "biologischen Oxydation", dagegen findet die Glykolyse vornehmlich im Zytoplasma statt (STÜTTGEN[56]).

Bei qualitativer Gleichartigkeit des Energiestoffwechsels bestehen quantitative Unterschiede, die sich aus organischer Herkunft der Zelle und ihrem Funktionszustand ergeben. Dabei sollen "proportionskonstante Enzymgruppen" (BÜCHER), bei denen die Aktivitäten in jeweils festem Verhältnis zueinander bei durchaus unterschiedlichen Absolutwerten stehen, gewahrt bleiben (RASSNER[49]).

Für die Haut sind die einzelnen Enzyme des Energiestoffwechsels und ihre Aktivitäten von verschiedenen Autoren histochemisch oder biochemisch nachgewiesen und zum Teil auch quantitativ bestimmt worden. Zusammenfassende diesbezügliche Darstellungen liefern z.B. LEONHARDI[36], BRAUN-FALCO[7], WEHRMANN[63], und STÜTTGEN[56] für die menschliche und RASSNER[49] für die Meerschweinchen-Haut. Auf Unterschiede im Enzymbesatz bei Menschen- und Meerschweinchenepidermis weisen RASSNER[49] und SALFELD[51] hin.

Die wohl gebräuchlichste Methode, Atmung und anaerobe

Glykolyse eines Gewebes zu bestimmen, ist das manometrische Verfahren, wie es von O.v.WARBURG angegeben wird (BAMANN-MYRBÄCK[4]). Hier liefert der Energiestoffwechsel bei der Endoxydation mit dem Sauerstoffverbrauch bei der Atmung und mit der Milchsäurebildung bei der anaeroben Glykolyse gut meßbare Größen, die zu der Intensität in der Energieproduktion proportional verlaufen.

Die ersten manometrischen Bestimmungen zur Hautatmung wurden 1921 von GESSLER an der Schweinehaut und für menschliche Haut 1923 von GANS[21] durchgeführt. WOHLGEMUTH u.M.[65] untersuchten dann 1926 die anaerobe Glykolyse der Haut. Schon sie fanden bei ihren Untersuchungen, daß die Haut ein Gewebe mit verhältnismäßig hoher anaerober Glykolyse bei relativ geringer Sauerstoffatmung darstellt. Sie bestimmten ein durchschnittliches Verhältnis von 3 zu 1. Das entspricht ungefähr den späteren Befunden von BUHMANN[8] und STÜTTGEN[55]. Bei BARRON u.M.[5] und FUHRMANN[19] hingegen lag die anaerobe Glykolyse relativ niedriger.

Bei der quantitativen Bestimmung der a e r o b e n Glykolyse ergaben sich recht unterschiedliche Ergebnisse (LEONHARDI[36]). Zumeist wurde aber eine Gärung auch unter aeroben Bedingungen gefunden, bei manchen Untersuchungen (CRUICKSHANK u.M.[14], STÜTTGEN[55]) war sie sogar recht erheblich. Das könnte dafür sprechen, daß in der Haut der Pasteur-Effekt - in Gegenwart von Sauerstoff Unterdrückung der Milchsäurebildung - gestört ist (STÜTTGEN[56]).

Den Stoffwechselmodus der Haut mit einer vorwiegend glykolytischen Energiegewinnung bestätigen auch enzymatische Untersuchungen an der Meerschweinchenepidermis von RASSNER[49], der hier im Vergleich zu anderen Geweben verstärkte Enzymaktivitäten der Glykolyse, des Pentose-Phosphat-Zyklus und im Aminosäuremetabolismus bei verhältnismäßig niedrigen Aktivitäten des Zitronensäure-Zyklus Enzyme fand.

Vorwiegend anaerobe Energiegewinnung ist nach WARBURG[62] auch ein Charakteristikum für Tumorgewebe. Dieser Gemeinsamkeit mit dem Hautstoffwechsel könnten ähnliche Bedingungen zugrundeliegen: Hohe Synthese- und Regenerationsrate bei relativem Sauerstoffmangel, dem die Epidermis als gefäßloses Gewebe ausgesetzt ist.

In der Folge versuchten dann zahlreiche Untersucher, mit der WARBURG-Methode Veränderungen im Energiestoffwechsel bei verschiedenen pathologischen Hautprozessen gegenüber gesunder Haut zu erfassen. So fand schon GANS[21] bei Psoriasis-Haut eine beträchtliche Steigerung der Atmungsintensität gegenüber der Norm. Dieser Befund wurde später auch von BUHMANN[8], LEIBSOHN u.M.[35], v. GLASENAPP u.M.[23] und STÜTTGEN[55] bestätigt, wobei letztere eine relativ noch stärkere Zunahme der anaeroben Glykolyse feststellten. Auch bei entzündlicher Haut (GANS[21], LEONHARDI[37]), Ekzem (STÜTTGEN[55]), Neurodermitis-Herden (BUHMANN[8], LEIBSOHN u.M.[35], LEONHARDI[37])und bei Lupus vulgaris (GANS[21], LEONHARDI[37]) wurden höhere Stoffwechsel-Quotienten gemessen. Dagegen zeigte Haut mit Vitiligo (STÜTTGEN[56]) und Lichen ruber (LEONHARDI[37]) verminderte Atmungsaktivität. Das gilt auch für Vit.-B-Mangelzustände, wo die für die biologische Oxydation wichtigen Coenzyme Vit. B_1 und Vit. B_2 vermindert sind (LEONHARDI[37]). Erhöhter Energiestoffwechsel wurde noch für tumoröse Hautveränderungen nachgewiesen. So bestimmten GANS[21] die Atmung bei Cancroid, STÜTTGEN[55,56] Atmung und Glykolyse bei Mycosis fungoides, Epitheliom, Basaliom, Karzinom, Melanom und retothelialen Tumoren.

Neben der Bestimmung des Energiestoffwechsels in normaler oder pathologisch veränderter Haut wurde das manometrische Meßverfahren auch angewendet, um die Einwirkung verschiedener Stoffe auf Oxydation und Glykolyse zu prüfen. Das geschah einmal zum Nachweis bestimmter Stoffwechselmechanismen durch Hemmung und Blockierung im Enzymsystem durch Hinzufügen entsprechender Substrate.

Bernsteinsäuredehydrogenase in der Haut wurde z.B. dadurch nachgewiesen, daß nach Zugabe von Malonat die Hautatmung stark sank, weil durch kompetitive Hemmung die Bildung von Fumarsäure aus Bernsteinsäure verhindert wurde (v.GLASENAPP u.M.[23]). Ähnlich verlief der Nachweis anderer am Zitronensäure-Zyklus beteiligter Enzyme wie Apfelsäure-Dehydrogenase, Fumarase, α-Ketoglutarsäure-Dehydrogenase (BARRON u.M.[5], GRIESEMER u.M.[25], LEONHARDI[36]) und Isozitronensäure-Dehydrogenase (CRUICKSHANK u.M.[15]). Hier erbrachte die Zugabe der entsprechenden Substrate jeweils ein Ansteigen in der Atmungsintensität. Mit Monojodacetat oder Fluorid kann selektiv in die Glykolyse eingegriffen werden (v. GLASENAPP u.M.[23], STÜTTGEN[55]). Das Cytochromoxydase-Cytochrom-System kann durch Zyanid (v. GLASENAPP u.M.[23]), CO oder Narkotika ausgeschaltet, und so ein Stillstand im Atmungsprozeß hervorgerufen werden (LOEBEL[39]). Die oxydative Phosphorylierung wird durch Anwesenheit von 2,4-Dinitrophenol gestört (v. GLASENAPP u.M.[23]). Es kommt zu einer Entkoppelung von Oxydation und Phosphorylierung, und bei gesteigertem Sauerstoffverbrauch resultiert eine geringe Energieausbeute.

Weiterhin bestimmte man die Einwirkung verschiedener Hormone auf die Hautatmung. WOHLGEMUTH u.M.[65] wiesen an der Meerschweinchenhaut nach, daß Thyreoglandol am stärksten, dann auch Ovoglandol und Testiglandol die Atmung erheblich stimulieren, Insulin und besonders Hypophysin stark hemmend wirken. Die Ergebnisse mit Adrenalin blieben wegen der leichten Zersetzlichkeit der Präparate unsicher. Abweichend davon fanden STÜTTGEN u.M.[57] bei der Hautatmung durch Zusatz von Sexualhormonen im allgemeinen nur in therapeutischer Dosierung eine gewisse Steigerung, bei höheren Konzentrationen Hemmung. Die Thyroxinwirkung bestätigte später FREINKEL[18] an der Rattenhaut. Einen beträchtlichen Anstieg des Gesamtstoffwechsels in der menschlichen Epidermis beobachteten KLUDAS u.M.[33] nach vorhergehender Behandlung der Haut mit Placenta-Salben. Über Untersuchungen mit NNR-Hormonen berichtet LEONHARDI[37]. Er fand nach lokaler Anwendung einer 1%-Hydrocortisonsalbe oder Zusatz eines wasserlöslichen Hydrocortisonesters Hemmung der

Atmung zwischen 20 - 35 Prozent und der Glykolyse um 17 - 23 Prozent. Auch verschiedene Vitamine wurden auf ihre Einwirkung auf die Atmung untersucht (z.B. ADAMS[1], PRESNELL[44], SURE u.M.[58], HASTINGS u.M.[27]). LEONHARDI[37] stellte nach Zusatz von Vit. A, Vit. C und einigen Stoffen aus der Vit. B-Gruppe wie Pyridoxalphosphat, Pantothensäure und Nicotinsäureamid keine Änderung in der Atmungsintensität bei normaler Rattenhaut fest. Isonicotinsäurehydrazid dagegen wirkte suppressiv. Auch andere in der Therapie verwendete Substanzen wie Salizylsäure und Resochin zeigten nach Zusatz keine Änderung im O_2-Verbrauch. Gegenüber der Norm niedrigere Werte wurden nach lokaler Behandlung mit verschiedenen Teerarten (LEONHARDI[37]) und Quecksilbersalben (STÜTTGEN[55]) gemessen.

Bei unseren Untersuchungen soll nun festgestellt werden, ob Substanzen aus der Gruppe der Zytostatika, von denen einige zunehmend Bedeutung auch in der Dermatologie gewinnen, bei in vitro-Versuchen mit Meerschweinchen-Epidermis einen Einfluß auf die Gewebsatmung haben. Auch hierzu sind andererseits schon einige Beobachtungen gemacht worden, auf die wir unten zurückkommen werden.

Unter Zytostatika versteht HEILMEYER[28] chemische Substanzen unterschiedlicher Struktur, die in verschiedener, in Einzelheiten weitgehend ungeklärter Weise in den Stoffwechsel der Zelle eingreifen und dadurch die Entwicklung der betroffenen Zellen - und hier vor allem die mit gesteigerter Proliferationstendenz - hemmen. Die Zahl der zytostatisch wirkenden Mittel ist groß. Diese gehören unterschiedlichen chemischen Gruppen an. Nach ihrer Wirkungsweise und Struktur können die therapeutisch verwendeten Zytostatika wie folgt eingeteilt werden (nach NEVINNY[41]) :

1. Alkylierende Substanzen
   a) Stickstofflost-Verbindungen
   b) Äthylenimine
   c) Methylsulfonsäure-Ester
2. Antimetabolite
   a) Folsäure-Antagonisten
   b) Purin-Antagonisten
   c) Pyrimidin-Antagonisten
3. Pflanzliche Alkaloide

Weiterhin sind in der zytostatischen Therapie gebräuchlich:

4. Hormone
   (Östrogene, Androgene, Corticosteroide)
5. Antibiotika (z.B. Actinomycin)
6. Methylhydrazin-Derivate

Aus diesen Gruppen verwendeten wir bei unseren Versuchen folgende Präparate: Von den alkylierenden Substanzen Tris-äthylenimino-benzochinon (TRENIMON®), dann als Folsäure-Antagonisten Amethopterin (METHOTREXAT®) und schließlich Vincristinsulfat (VINCRISTIN LILLY®) aus der Gruppe der Alkaloide.

2,3,5-Tris-äthylenimino-benzochinon-(1,4) (Trenimon) ist in seinen Stoffwechselwirkungen genauer von PÜTTER[45,46,47], PÜTTER u.M.[48] untersucht worden. Wegen der besonders schnell einsetzenden Wirkung wird bei dieser Substanz neben einer direkten Einwirkung auf die Zellteilung - wahrscheinlich durch Reaktion mit Amino-Gruppen von Eiweißmolekülen der Kernsubstanz (DNS) - auch eine hemmende Beeinflussung des Energiehaushaltes vermutet. Allerdings soll letzteres erst bei vergleichsweise höheren Konzentrationen nachweisbar werden. LISS u.M.[38] fanden schon DNS-Synthesestörungen durch Trenimon-Konzentrationen, bei denen DPN-Gehalt und anaerobe Glykolyse noch unverändert waren. An Ehrlich-Ascites-Karzinomzellen

wurde eine eindeutige Hemmung von Atmung und Glykolyse durch Trenimon in einer Konzentration von 10^{-5} mol gefunden (PÜTTER u.M.[48]). Auch bei normalem Gewebe wurde dieser Effekt deutlich, hier jedoch erst in höheren Konzentrationen. Die Beeinträchtigung der Atmung soll in erster Linie durch Hemmung der Acyl-Aktivierung zustande kommen (PÜTTER[46]). So zeigte sich z.B. die Bildung von Acetyl-Coenzym A, eine wichtige Schaltstelle im intermediären Stoffwechsel, beeinträchtigt. Ferner greift Trenimon auch durch Störung der oxydativen Phosphorylierung in die Energiespeicherung ein. Die hemmende Wirkung von Trenimon auf die Milchsäuregärung wird v.a. auf die Senkung des Zellgehaltes an DPN, ein für einige glykolytische Teilreaktionen erforderliches Koferment, zurückgeführt (PÜTTER[46]).

Amethopterin chemisch 4-Amino-N^{10}-methylpteroylglutaminsäure (METHOTREXAT), wird zur Gruppe der Antimetabolite gezählt. Das sind normalen Bausteinen des Zellstoffwechsels weitgehend ähnliche Substanzen ohne deren biologische Wirksamkeit. Dadurch kommt es zu Synthese-Fehlleistungen und Blockierung wichtiger enzymatischer Reaktionen. Methotrexat hemmt als Folsäureantagonist die Folsäure-Reduktase, die für die Bildung der Tetrahydrofolsäure von Bedeutung ist. Derivate der Tetrahydrofolsäure sind im Organismus zur Übertragung von C_1-Körpern und zur Purin-Synthese notwendig. Methotrexat wird in der Dermatologie teilweise zur Behandlung von Kollagenosen, Mycosis fungoides und in zunehmendem Maße in der Therapie der schweren Psoriasis angewendet (REES[50]). LEONHARDI[37] hat bei seinen Versuchen mit Aminopterin einen Einfluß auf die Atmung bei psoriatisch veränderter Haut nicht gefunden.

Vincristin ist ein Alkaloid aus dem tropischen Immergrün Vinca rosea L. Diese Substanz soll durch Blockierung der Metaphase zytostatisch wirksam werden (PALMER u.M.[43], CARDINALI u.M.[10], GÖBER[24]). Aber auch ein Einfluß auf die Stoffwechselmechanismen des Zitronensäurezyklus wird vermutet (SVOBODA[59]).

Bevor wir mit unseren Versuchsserien mit den Zytostatika begannen, mußte eine Standardmethode gefunden werden, die für größere Serien optimale Bedingungen bietet, ohne zu aufwendig zu werden. Hier ist besonders wichtig die Frage nach dem Inkubationsmedium und eventuellen Zusätzen. Wie groß der Einfluß der Inkubationslösung auf die Stoffwechselintensität der Haut ist, fanden z.B. schon BARRON u.M.[5], v.GLASENAPP u.M.[23], GRIESEMER u.M.[25], GILBERT[22]. Das Medium muß in jedem Falle unphysiologisch sein und schafft so für die in-vitro-Versuche Gegebenheiten, die Rückschlüsse auf in-vivo-Verhältnisse nicht ohne diese Vorbehalte gestatten. Die gemessenen Stoffwechselaktivitäten stellen also weniger ein Maß für den Normalstoffwechsel dar, sondern geben eher Hinweise dafür, inwieweit sich das Gewebe an unphysiologische Bedingungen anpassen kann (GILBERT[22]). Von großen latenten Stoffwechselkapazitäten der Epidermis, die unter Stressbedingungen ausgenutzt werden können, sprechen GRIESEMER u.M.[25]. Besonders problematisch in der Beurteilung sind hier Präparate mit Homogenaten, wo zusätzlich die lokale Anordnung von Enzymsystemen und Konzentrationsverhältnissen teilweise zerstört wird.

Bei der Arbeit mit Hautpräparaten muß beachtet werden, daß die einzelnen Hautschichten einen quantitativ sehr unterschiedlichen Stoffwechsel aufweisen. Für die Epidermis wurden durchweg höhere Aktivitäten gemessen als in der Dermis (WOHLGEMUTH u.M.[65], BUHMANN[8], CRUICKSHANK u.M.[14], STÜTTGEN[55], LEIBSOHN u.M.[35], FITZGERALD u.M.[17]). Allerdings war das Verhältnis bei den einzelnen Autoren teilweise recht unterschiedlich: LEIBSOHN u.M.[35] fanden bei ihren Atmungsbestimmungen für die Epidermis mehr als neunmal höhere Werte als bei der Dermis, während STÜTTGEN[55] den Atmungsstoffwechsel in der Epidermis nur um 50 - 80 Prozent gegenüber der Dermis erhöht fand. Hier äußert sich zum Teil die Schwierigkeit der Trennung der verschiedenen Hautschichten, die auf sehr unterschiedliche Weise vorgenommen wurde. So werden mehrere mechanische Trennungsverfahren beschrieben (SCOTT[53], GRIESEMER u.M.[25], STÜTTGEN[55], LEIBSOHN u.M.[35], KLUDAS u.M.[33]).

CRUICKSHANK u.M.[14] trennten mit Trypsin, FITZGERALD u.M.[17] mit Elastase. Manchmal wurde der Epidermisstoffwechsel nur anteilmäßig nach histologischer Kontrolle aus dem Gesamt-Hautstoffwechsel bestimmt (BUHMANN[8]).

Auch die Epidermis ist in sich kein einheitliches Gebilde. In Bezug auf den Energiestoffwechsel unterscheiden sich ein Stratum oxybioticum mit dem Stratum basale von dem Stratum anoxybioticum, zu dem das Stratum granulosum, lucidum und corneum gezählt werden (STÜTTGEN[56]). Hinzu kommen noch die Veränderungen, die durch die Hautanhangsgebilde, wie Drüsen und Haare, hervorgerufen werden.

Neben der Schwierigkeit einer einheitlichen Materialgewinnung ergeben sich bei Epidermisversuchen weitere Störfaktoren durch die Verschmutzung und Keimbesiedlung mit Bakterien oder Pilzen, die nur schwerlich auszuschalten sind.

II. VERSUCHSANLAGE, -MATERIAL UND METHODIK

A Versuchsanordnung

Atmung und anaerobe Glykolyse wurden manometrisch mit der Apparatur nach OTTO v.WARBURG bestimmt (BAMANN u.M.[4], BEGRMEYER[6], KEIL u.M.[32]). Als Maß für die Atmungsintensität galt der O_2-Verbrauch. Leichtes, 2-3-minütliches Durchströmen der Reaktionsgefäße mit reinem Sauerstoff kurz vor Schließung des Meßsystems sorgte bei den Versuchen zur Atmungsbestimmung für eine starke O_2-Anreicherung. Das bei der Atmung entstehende Kohlendioxyd sollte durch 0,2 ml einer 2n KOH absorbiert werden, die in einen Einsatz im Reaktionsgefäß pipettiert wurden. Um die Absorptionsfläche zu vergrößern, tauchten wir ein gefaltetes Stück Filterpapier von der Größe 1 mal 1 cm in die Kalilauge im Einsatz.

Die anaerobe Glykolyse wurde durch die CO_2-Bildung, die durch Freiwerden aus dem Bicarbonat infolge der Milchsäurebildung aus Zucker entsteht, bestimmt. Hier entfernten wir den Sauerstoff aus dem System durch fünf Minuten anhaltendes Durchströmen mit einem Gasgemisch von 95 % N_2 und 5 % CO_2.

Bei unseren Versuchen verwendeten wir Reaktionsgefäße von 12 - 14 ml Rauminhalt mit eingebautem Einsatz. Die eingebrachten Flüssigkeitsmengen (Suspension, Zusätze und bei Atmungsbestimmungen KOH) lagen zwischen 3,0 und 3,2 ml.

Die Versuchstemperatur wurde durch ein Thermostatenbad konstant auf 37,0°C gehalten. Um eine ständige Durchmischung der Suspensionen zu erreichen, waren die Reaktionsgefäße mit einer Schüttelapparatur verbunden. Die Schüttelfrequenz lag bei 100 pro Minute bei einer Amplitude von ungefähr 4 cm.

Mehrere Reaktionsgefäße liefen bei jedem Versuch als Leerwerte, also ohne Epidermis, mit. Mit Hilfe dieser Thermobarometer konnten Temperaturschwankungen und Änderungen des äußeren

Luftdruckes korrigiert werden.

Die erste Ablesung bei den Versuchen erfolgte jeweils nach 20 Minuten Temperaturausgleich im Thermostatenbad, also rund 60 Minuten nach Tötung der Tiere. Die Messungen wurden in der Regel bis zu 3 Stunden unternommen, während der ersten Stunde alle 15 Minuten, später alle 30 Minuten.

B Versuchsmaterial

Die Epidermis wurde von 250 - 350 g schweren männlichen Albino-Meerschweinchen gewonnen. Bei jedem Versuch wurden die im allgemeinen 8 Reaktionsgefäße mit der Epidermis eines Meerschweinchens beschickt. Wir töteten die Tiere durch Genickschlag, präparierten Rücken- und Seitenhaut frei und bewahrten diese in einem durch Eisbad gekühlten Gefäß auf. Die Hautstückchen wurden auf einem Streckbrett gestreckt und mit einer Kocherklemme sorgfältig epiliert. Anschließend erfolgte eine grobe Reinigung durch Abtupfen mit einem Ätherbausch. Die Epidermis wurde dann mit einem nicht zu scharfen Skalpell von ihrer Unterlage abgeschabt. Eine histologische Kontrolle zeigt, daß mit dieser recht einfachen Methode die Epidermis vollständig und höchstens mit nur wenig Anteilen tieferer Gewebsschichten gewonnen werden konnte.

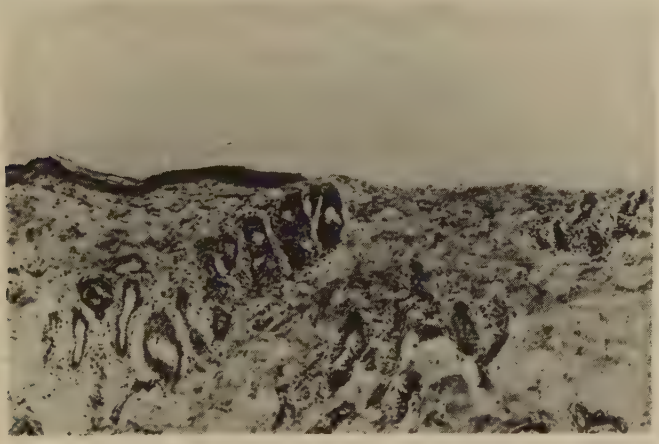


Abb.1: Unbehandelte neben abgeschabter Haut mit Haarfollikeln nach Epilation

Die so gewonnene Epidermis verwendeten wir teils als Homogenate, teils als Gewebeschnitte. Die Homogenisation erfolgte vor Einbringen in die Reaktionsgefäße in der jeweiligen Suspensionslösung, und zwar die Epidermis für einen Versuch

(8 Reaktionsgefäße) zusammen. Das geschah einmal aus Gründen der Zeitersparnis und technischer Einfachheit, zum anderen, um gleiche Homogenisationsbedingungen bei allen 8 Ansätzen zu gewährleisten. Das Homogenat wurde dann mit einer Pipette mit möglichst großer Ausflußöffnung in die Reaktionsgefäße gebracht.

Bei den übrigen Versuchen wurde die Epidermis nicht homogenisiert. Die abgeschabten Epidermisstückchen wurden in toto in die einzelnen Reaktionsgefäße eingebracht. Sie erfüllen die Bedingungen, die WARBURG für die Verwendung von Gewebeschnitten bei Atmungsversuchen aufstellte. WARBURG bestimmte eine Grenzschnittdicke von maximal 0,2[illegible] mm bei normaler Luft und von 0,5 mm für Versuche bei reiner Sauerstoff-Atmosphäre (CRUICKSHANK u.M.[13]). Die Meerschweinchenepidermis bleibt mit ihrer Dicke, die von H.OBERSTE-LEHN u.M.[42] mit im Mittel 25,4 µ und von SCHAAF[52] mit durchschnittlich 26,1 µ bestimmt wurde, erheblich unter diesen Werten. Im Folgenden sprechen wir daher etwas vereinfachend trotz unterschiedlicher Art der Herstellung von Gewebeschnitten.

Die Epidermismenge betrug bei Homogenaten und Gewebeschnitten jeweils rund [illegible]0 mg pro Reaktionsgefäß und 3 ml Suspensionsmedium. Die Gewichtsbestimmung erfolgte vor Versuchsbeginn als Feuchtgewicht.

C Auswertung der Versuchsergebnisse

Die Berechnung und Auswertung der Versuchsergebnisse wurde nach den hier üblichen Richtlinien ausgeführt. Bestimmt wurde bei Atmungsmessungen der Stoffwechsel-Quotient Q_{O_2}, d.h. die Menge des verbrauchten Sauerstoffs in mm^3 pro mg Gewebe pro Stunde, nach der Formel:

$$Q_{O_2} = \frac{X \text{ (verbrauchte Gasmenge in } mm^3)}{\text{Gewicht des Gewebes (mg)} \cdot \text{Versuchszeit (h)}}$$

wobei $X = K \cdot h$ ist. h entspricht der Druckdifferenz in mm Sperrflüssigkeit (BRODIE-Lösung), korrigiert nach den Thermobarometern. Die Gefäßkonstante K ergibt sich aus:

$$K = \left(\frac{V_G \cdot \frac{237}{T} + V_F \cdot a}{P_o} \right)$$

(V_G = Gasvolumen des geschlossenen Systems

V_F = in die Reaktionsgefäße eingebrachte Flüssigkeitsmenge

P_o = Normaldruck, d.s. 700 mm Hg, entsprechend 10 ooo mm BRODIE-Lösung

T = Absorptionskoeffizient. Bei unseren Berechnungen wurde etwas vereinfacht für alle Suspensionsmedien mit demselben Wert gearbeitet:

$a_{O_2} = 0{,}0239$; $a_{CO_2} = 0{,}565$.)

Zur Bestimmung der anaeroben Glykolyse wurde entsprechend der Stoffwechsel-Quotient Q_{CO_2}, also die Menge des entwickelten Kohlendioxyds in mm^3 pro mg Gewebe pro Stunde, errechnet.

Bei unseren Versuchen erfolgten die Bestimmung der Stoffwechsel-Quotienten für das in normalem, also feuchtem Zustand gemessene Gewebsgewicht. Würde man das Trockengewicht zu Grunde legen, müßte man das Verhältnis Feuchtgewicht zu Trockengewicht wie 4,0 zu 1 berücksichtigen. Diesen Faktor erhielten wir als Mittelwert aus 10 Messungen.

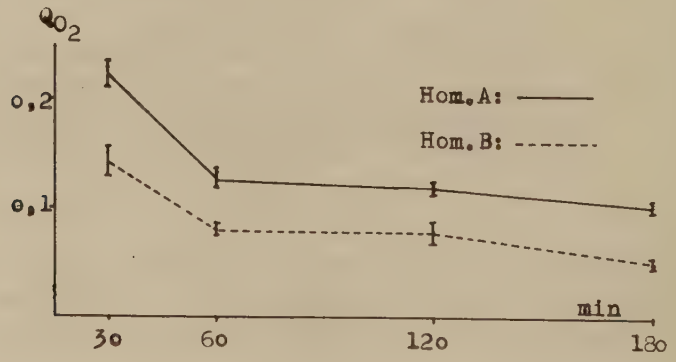
III. E R G E B N I S S E

A Vorversuche

1. Epidermisvorbereitung

Die Homogenisation erfolgte mit dem ULTRA-TURRAX- Homogenisator der Fa. JANKE und KUNKEL K.G. in einem Kältebad (Salz-Eis-Mischung).

Um eine mögliche Beeinflussung der O_2-Verbrauchsrate bei den Atmungsversuchen von der Dauer des Homogenisierens und von der Umdrehungsgeschwindigkeit des Gerätes zu ermitteln, wurde folgender Parallelversuch durchgeführt (Tab.1). Ein Homogenat A, das 3 mal 30 sec mit jeweils 30 sec Pause zum Abkühlen mit 15 000 Umdrehungen pro Minute homogenisiert wurde, wird mit einem Homogenat B (2 mal 30 sec mit jeweils 30 sec Pause bei 2 100 Umdrehungen pro Min.) verglichen.

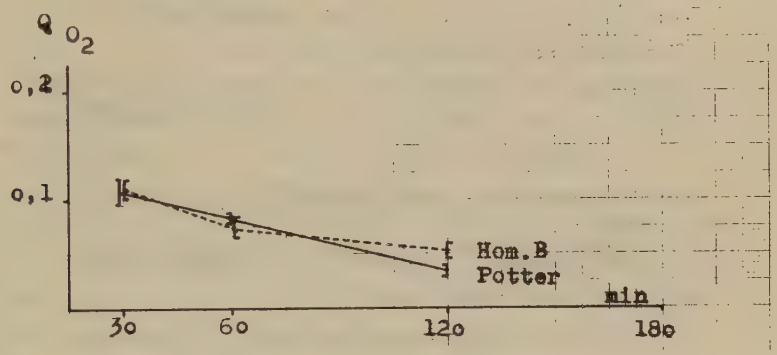


Tab.1 Der Stoffwechsel-Quotient Q_{O_2} für die Epidermishomogenate A und B (s.o. im Text). Suspensionsmedium: 0,7 mol Phosphat-Puffer nach Sörensen.

[Tab.1 und Tab.2 zeigen jeweils die Mittelwerte von 2 Versuchstieren mit je 6 Reaktionsansätzen mit ihren Standardabweichungen s (MITTENECKER[40])]

Es ergab sich also eine starke Abhängigkeit des Q_{O_2} vom Homogenisationsverfahren. So erreichte z.B. bei unserem Versuch der durchschnittliche Q_{O_2} für die ersten 60 Minuten bei stärkerer Homogenisation (Hom. A) um rund 50 % höhere Werte als bei kürzer andauerndem und bei niedriger Tourenzahl durchgeführtem Homogenisieren (Hom. B).

Vergleichsweise wurde ein von GRIESEMER u.M.[25] empfohlener POTTER-Homogenisator (5 ml) angewendet (60 sec in einem Kältebad).



Tab.2 Q_{O_2} für ein POTTER-Homogenat und für ein Homogenat, das mit dem ULTRA-TURRAX nach den oben für Hom. B angegebenen Richtlinien hergestellt wurde (2 mal 30 sec bei 2 100 Umdrehungen).

Es ergaben sich ähnlich niedrige Werte wie bei kurzzeitiger Homogenisation mit dem ULTRA-TURRAX bei niedriger Tourenzahl.

Bei allen folgenden Versuchsreihen mit Homogenaten wurde folglich wie oben mit Hom. A verfahren: 3 mal 30 sec bei einer Tourenzahl von 15 000 pro Minute.

2. Suspensionsmedien für Homogenate und Schnitte bei den Atmungsversuchen und die Wirkung verschiedener Zusätze

Suspensionslösungen

Bei den Versuchen zur Bestimmung der Atmungsgrößen wurden für Homogenate und Schnitte verschiedene Suspensionen auf ihre Wirkung auf den Q_{O_2} untersucht und miteinander verglichen.

Für Epidermis-Schnitte wurden geprüft:

A] Phosphat-Krebs-Ringer-Lösung (Tab.3)
[100 Teile 0,154 mol NaCl, 4 Teile 0,154 mol KCl, 3 T. 0,11 mol $CaCl_2$, 1 T. 0,154 mol $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 1 T. 0,154 mol KH_2PO_4, 11,2 T. 0,1 mol Phosphat-Puffer]

B] Earle'sches Medium (WILLMER[64]), hier ohne $NaHCO_3$ (Tab.4)
[100 Teile NaCl, 6 Teile KCl, 3 T. $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 2 T. 0,1 mol $NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$]

C] 'Kultur-Medium nach CRUICKSHANK'[12] (Tab.5)
[5 Teile homologes Serum, 3 T. o.a.Phosphat-Krebs-Ringer-Lösung, 1 T. 5% Glucose, 1 T. Streptomycin (500 µg/ml)]

Für Epidermis-Homogenate:

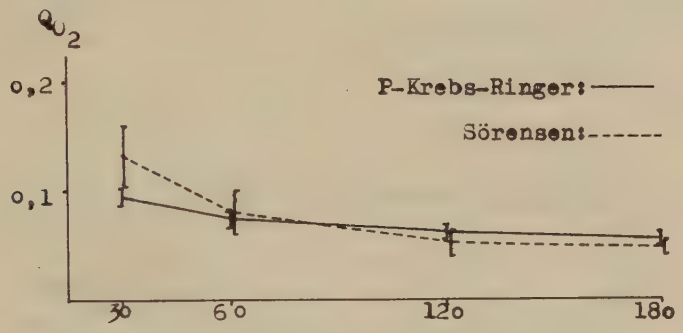
A] Phosphat-Krebs-Ringer-Lösung (s.o.) (Tab.6)

B] 0,1 mol K-Phosphat-Puffer nach den Vorstellungen von GRIESEMER u.M.[25], die für Homogenate ein Kalium-reiches Milieu fordern.

C] 'Medium für Gewebebrei nach KEIL u.M.'[32] (Tab.7), das keine Ca-Ionen enthält, die nach BAMANN u.M.[4] die Atmung hemmen sollen.
[100 Teile NaCl, 4 T. KCl, 1 T. $MgSO_4$, 30 T. Phosphat-Puffer]

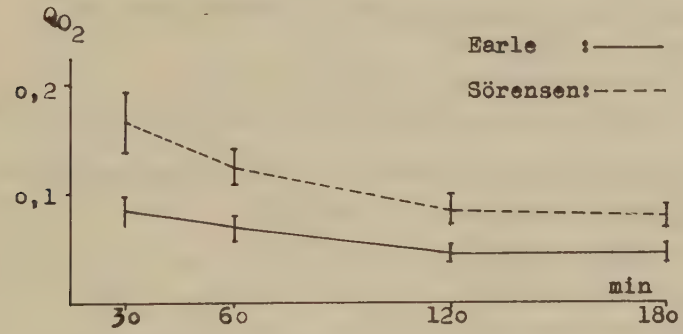
D] 0,07 mol Phosphat-Puffer nach Sörensen (HINSBERG[30]) ($Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$/ KH_2PO_4) (Tab.7)
Alle benutzten Lösungen waren auf einen pH von 7,4 eingestellt.

Die Versuche mit den Epidermis-Schnitten zeigten folgende Resultate:



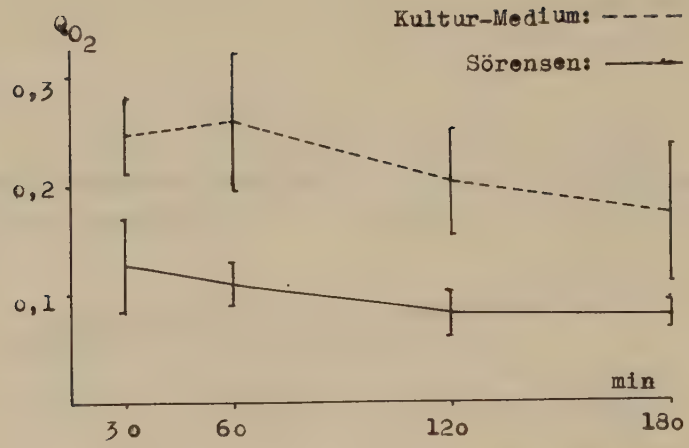
Tab.3 Q_{O_2} von Epidermis-Schnitten inkubiert in Phosphat-Krebs-Ringer-Lösung, verglichen mit parallel durchgeführten Epidermishomogenaten in 0,07 mol Sörensen-Puffer.

[Mittelwerte von 5 Versuchstieren mit insgesamt 15 Reaktionsansätzen mit ihren Standardabweichungen s.]



Tab.4 Q_{O_2} von Epidermis-Schnitten in Earle'scher Lösung verglichen mit paralleldurchgeführten Epidermis-Homogenaten in 0,07 mol Sörensen-Puffer.

[Mittelwerte von 5 Versuchstieren mit insgesamt 14 Reaktionsansätzen und ihre Standardabweichungen s.]



Tab.5 Q_{O_2} von Epidermis-Schnitten bei Inkubation in 'Kultur-Medium nach CRUICKSHANK'

[Mittelwerte von 3 Tieren mit 12 Ansätzen verglichen mit parallel durchgeführten Homogenaten in Sörensen-Puffer.]

Legt man den Sauerstoffverbrauch in den ersten 30 Minuten zugrunde, so ergibt sich ein Q_{O_2} von:

(A) bei P-Krebs-Ringer-Lsg. als Inkubationsmedium: 0,095 (s = 0,008)
(B) bei Earle'scher Lsg.: 0,085 (s = 0,014)
(C) bei 'Kultur-Medium nach CRUICKSHANK': 0,245 (s = 0,036).

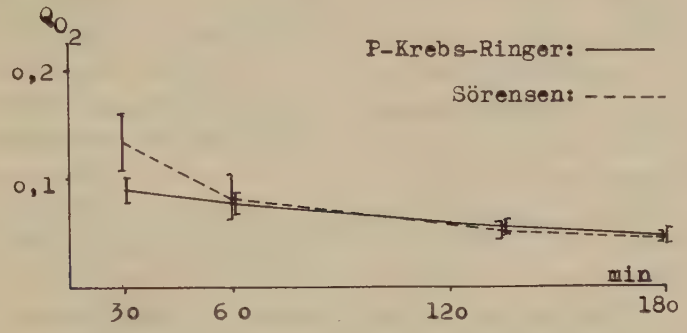
Bei einer Versuchsdauer von 3 Stunden betrug der durchschnittliche Stoffwechsel-Quotient für:

(A) P-Krebs-Ringer-Lsg.: 0,078
(B) Earle'sche Lsg.: 0,055
(C) 'Kultur-Medium n.C.': 0,214

Die Atmungsintensität nahm während der Versuche ständig ab. Folgende Abklingquoten im O_2-Verbrauch pro Stunde konnten errechnet werden:

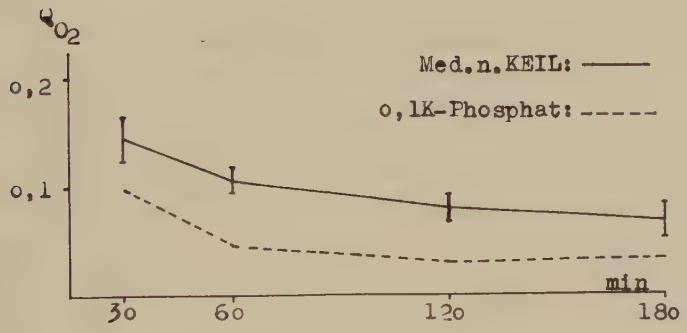
(A) P-Krebs-Ringer-Lsg.: rund 16 Prozent
(B) Earle'sche Lsg.: rund 19 Prozent
(C) 'Kultur-Medium n.C.': rund 12 Prozent

Bei der Untersuchung von Epidermis-Homogenaten in den o.a. Suspensionsmedien ergaben sich folgende Werte:



Tab.6 Q_{O_2} von Epidermis-Homogenaten inkubiert in Phosphat-Krebs-Ringer-Lösung verglichen mit parallel durchgeführten Homogenaten in 0,07 mol Sörensen-Puffer.

[Mittelwerte von 4 Versuchstieren mit insgesamt 12 Reaktionsansätzen und ihre Standardabweichungen s.]

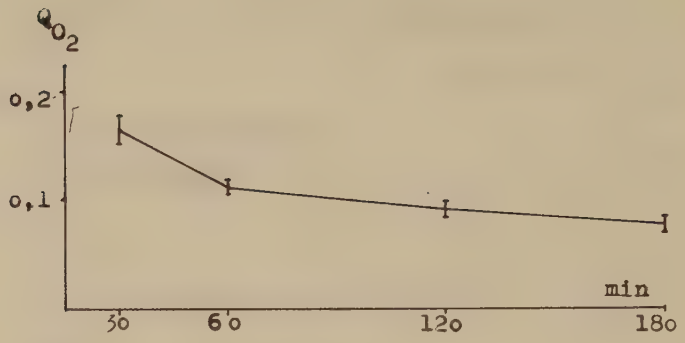


Tab.7 Q_{O_2} von Epidermis-Homogenaten inkubiert in 0,1 mol K-Phosphat-Puffer.

[Mittelwerte von 2 Versuchstieren mit 5 Ansätzen]

und in 'Medium für Gewebebrei nach KEIL'

[Mittelwerte von 7 Versuchstieren bei 21 Ansätzen.]



Tab.8 Q_{O_2} von Epidermis-Homogenaten inkubiert in 0,07 mol Phosphatpuffer nach Sörensen

[Mittelwerte von 16 Versuchstieren mit insgesamt 48 Reaktionsansätzen.]

Bei den Homogenaten ergibt sich bei Zugrundelegen des Sauerstoffverbrauchs in den ersten 30 Minuten ein Q_{O_2} von:

(A) bei P-Krebs-Ringer-Lsg. als Inkubationsmedium: 0,090
(B) bei 0,1 mol K-Phosphat-Puffer: 0,099
(C) bei 'Medium f.Gewebebrei n.KEIL': 0,145
(D) bei 0,07 mol Sörensen-Puffer: 0,165

Durchschnittlicher O_2-Verbrauch für die ersten 3 Stunden, die normale Versuchsdauer:

(A) P-Krebs-Ringer-Lsg.: 0,073
(B) K-Phosphat-Puffer: 0,043
(C) 'Medium f.Gewebebrei n.KEIL': 0,099
(D) Sörensen-Puffer: 0,109

Abklingquoten des O_2-Verbrauchs in Prozent und pro Stunde:

(A) P-Krebs-Ringer-Lsg.: rund 19 %
(B) K-Phosphat-Puffer: rund 26 %
(C) 'Medium f.Gewebebrei': rund 21 %
(D) Sörensen-Puffer: rund 22 %

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Höhe des O_2-Verbrauchs sich stark abhängig von dem gewählten Suspensionsmedium erwies. Die weitaus besten Ergebnisse erbrachte die Inkubation von Gewebeschnitten in dem 'Kultur-Medium nach CRUICKSHANK' (Tab.5) mit einem Q_{O_2} von 0,245 in den ersten 30 Minuten und 0,214 für 3 Stunden. Besonders fiel hier ein relativ langsames Absinken der Atmungsaktivität auf. Die Abklingquote betrug nur etwa 12 Prozent pro Stunde. Allerdings waren die Schwankungsbreiten bei den Versuchen recht groß, die Standardabweichungen lagen zwischen 0,036 und 0,062 (Tab.5). Am ungünstigsten erwies sich die Inkubation in 0,1 mol K-Phosphat-Puffer-Lösung (Tab.7): Der O_2-Verbrauch lag in den ersten 3 Stunden bei nur 20 Prozent der in 'Kultur-Medium' und bei 40 Prozent der bei Sörensen-Homogenaten erreichten Größen. Diese in einfachem 0,07 mol Phosphat-Puffer nach Sörensen inkubierten Homogenate ergaben relativ gute Resultate bei besonders geringer Schwankungsbreite (Standardabweichungen zwischen 0,06 und 0,013). Der Sörensen-Puffer erwies sich hier komplizierter zusammengesetzten Medien wie 'Medium für Gewebebrei' (Tab.7), Phosphat-Krebs-Ringer-Lösung (Tab.6) und Earle'scher Lösung überlegen, vor allem in der ersten Zeit nach Versuchsbeginn. So lag der Q_{O_2} für die ersten 30 Minuten für Sörensen-Homogenate bei 0,165 gegenüber 0,145 bei Homogenaten in 'Medium für Gewebebrei', 0,090 bei Homogenaten in P-Krebs-Ringer-Lösung und 0,085 bei Gewebeschnitten in Earle'scher Lösung. Allerdings lag die Abklingquote mit 22 % pro Stunde etwas höher als bei den Vergleichsmedien:

'Medium für Gewebebrei': 21 Prozent
P-Krebs-Ringer-Lsg. : 19 Prozent
Earle'scher Lsg. : 19 Prozent.

Für größere vergleichende Versuchsserien empfahl sich demnach der Puffer nach Sörensen als Inkubationsmedium. Hier war bei unseren Epidermisuntersuchungen Homogenaten gegenüber Gewebeschnitten der Vorzug zu geben, weil durch die Art der Herstellung Unterschiede, die sich aus lokal begrenzten Verschmutzungen der Epidermis, teilweise mangelhafter Epilation und regionaler Herkunft der Epidermisstückchen ergeben, am

ehesten ausgeglichen werden können, und die Schwankungsbreiten innerhalb der einzelnen Versuchsserien auch dadurch niedrig gehalten werden. Als weiterer Störfaktor bei den Epidermisschnitten erschien nämlich eine teilweise auftretende Zusammenfaltung und Knäuelung der Epidermisstückchen, die sich auch durch das Schütteln während des Versuches nicht löste. So ist das WARBURGsche Postulat einer bestimmten Grenzschnittdicke nicht mehr gegeben, die O_2-Diffusion gestört und es ergeben sich zwangsläufig niedrigere Atmungsgrößen.

Die Anwendung von 'Kultur-Medium nach CRUICKSHANK', dem bei unseren Versuchen optimalen Inkubationsmedium, in größerem Ausmaße wird eingeschränkt durch die große benötigte Menge an Meerschweinchenserum, die einen erheblichen Aufwand an Tieren erfordert.

Zusätze

Im weiteren prüften wir einige Zusätze zu den Inkubationslösungen auf ihren Einfluß auf den O_2-Verbrauch:

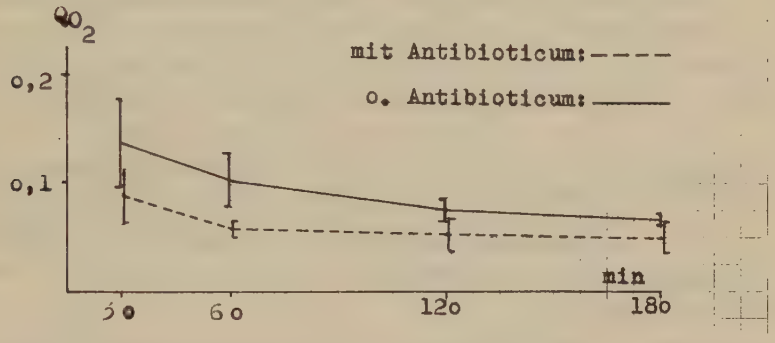
Glucose

Wie viele Voruntersucher (z.B. BAMANN u.M.[4], LOEBEL[39], STÜTTGEN[55], FUHRMANN[19], LEIBSOHN u.M.[35], KLUDAS u.M.[33]) fügten auch wir den Suspensionen Glucose als Energie lieferndes Substrat hinzu. Wir wählten eine mittlere Konzentration von 0,2 %. Bei vergleichenden Untersuchungen konnte keine eindeutige Einwirkung auf die Atmungsintensität festgestellt werden.

Antibiotika

Der Zusatz von Antibiotika erscheint gerade bei Epidermispräparaten erforderlich. Dies gilt natürlich besonders für länger währende Versuche. Wir verwendeten eine Konzentration von 50 µg/ml STREPTOTHENAT® wie WILLMER[64] und CRUICKSHANK[13]. (SPRINGELL[54] gibt in seinen Versuchen eine achtfache Konzentration von 400 µg/ml an.) Bei dieser Dosierung zeigten sich weder Senkung noch Steigerung im Sauerstoff-Verbrauch gegenüber Vergleichsreaktionen.

Ein Nebenversuch hierzu mit einem anderen Präparat, SUPRACILLIN®, und in höherer Konzentration (1 Tropfen auf 3 ml Suspension, das entspricht rund 1 000 IE Penicillin und 1,0 mg Streptomycin pro ml) brachte ein anderes Resultat (Tab.9). Um etwa ein Drittel wurde hier die Atmungsquote gesenkt. Dies ist besonders interessant im Vergleich zu den später bei der anaeroben Glykolyse gefundenen Ergebnissen.



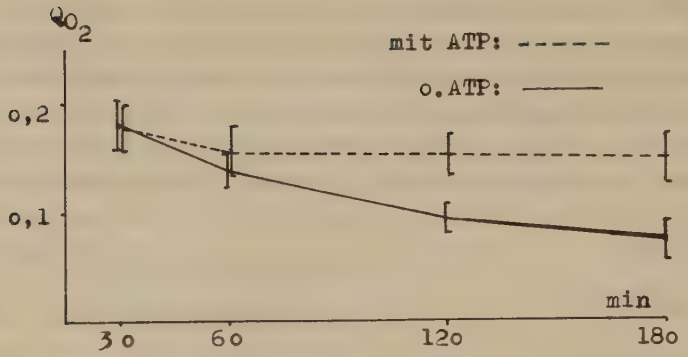
Tab.9 Wirkung eines Antibiotikumzusatzes von 1 Tropfen Supracillin auf 3 ml Inkubationslösung im Vergleich zu Reaktionen ohne Zusatz.

[Mittelwerte von jeweils 3 Versuchstieren mit 6 Ansätzen mit den Standardabweichungen. Es wurden Homogenate mit der Suspensionslösung 'Medium für Gewebebrei nach KEIL' verwandt.]

Adenosintriphosphat (ATP)

Nach GRIESEMER u.M.[25] gaben wir pro Reaktionsgefäß, also auf 3 ml Suspension, 0,2 ml einer 0,02 mol ATP-Lösung. Das entspricht einer Endkonzentration von 0,8 mg pro ml, der ungefähr zweifachen Konzentration menschlichen Vollblutes (HINSBERG[30]). (Tab.10 siehe nächste Seite!)

Wir erreichten also mit dem ATP-Zusatz eine erhebliche Steigerung im O_2-Verbrauch, die sich bei längerer Versuchsdauer zunehmend bemerkbar machte. Es resultierte ein wesentlich flacherer Verlauf der O_2-Verbrauchskurve mit geringerer Abklingquote. Während der Q_{O_2} für die ersten 30 Minuten durch ATP noch wenig beeinflußt erschien, bestand für den durchschnittlichen Q_{O_2} für die ersten 3 Stunden eine deutliche Differenz:



Tab.10 Q_{O_2} für Homogenate in Phosphatpuffer nach Sörensen mit ATP-Zusatz (0,2 ml einer 0,02 mol ATP gelöst in 0,9 % NaCl) im Vergleich zu Ansätzen ohne ATP (mit 0,2 ml einer 0,9 % NaCl-Lsg.)

[Mittelwerte von 4 Tieren mit jeweils 12 parallel durchgeführten Ansätzen.]

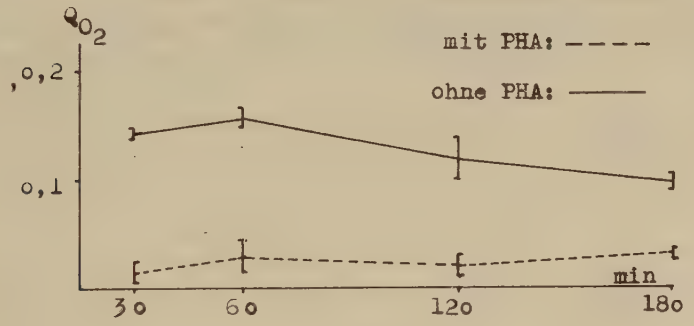
	Durchschnittlicher Q_{O_2} für 0 - 30 min	Durchschnittlicher Q_{O_2} für 0 - 180 min	Abklingquote pro h
ohne ATP	0,179	0,128	23 %
mit ATP	0,178	0,161	8 %

Allerdings lagen die Werte bei diesen direkt vergleichenden Untersuchungen allgemein etwas günstiger als der Durchschnitt aller Versuche, die im Zuge dieser Arbeit bei Sörensen-Homogenaten mit oder ohne ATP-Zusatz durchgeführt wurden. (Siehe hierzu Tab.8 und Tab.17)

Der atmungsaktivierende Effekt von ATP wurde auch in anderen Suspensionsmedien (Homogenate in 'Medium für Gewebebrei' n. KEIL) und bei Schnitten in Earle'scher Lösung in ähnlichen Größenordnungen festgestellt.

Phytohaemagglutinin

In einem weiteren Nebenversuch wurde der Suspension Phytohaemagglutinin (5 %) hinzugefügt. Phytohaemagglutinin, ein Mucoprotein, das 1955 von RIGAS und OSGOOD aus der Bohnenart Phaseolus vulgaris extrahiert wurde, wird Zellkulturen, und hier vor allem weißen Blutkörperchen, hinzugesetzt, um eine Vermehrung der Mitoserate zu erreichen (WILLMER[64]). Es ergab sich (Tab.11) eine überaus starke Reduzierung der Atmungsintensitäten durch den PHA-Zusatz. Interessant war, daß bei gleichzeitigem Vincristin-Zusatz die Phytohaemagglutinin-Wirkung aufgehoben schien. Jedoch wären hier weitere Untersuchungen erforderlich.



Tab.11 Q_{O_2} für Epidermis-Homogenate in Sörensen-Phosphatpuffer mit und ohne Phytohaemagglutinin-Zusatz.

[Mittelwerte von 3 Versuchstieren mit je 9 parallel durchgeführten Ansätzen und die Standardabweichungen]

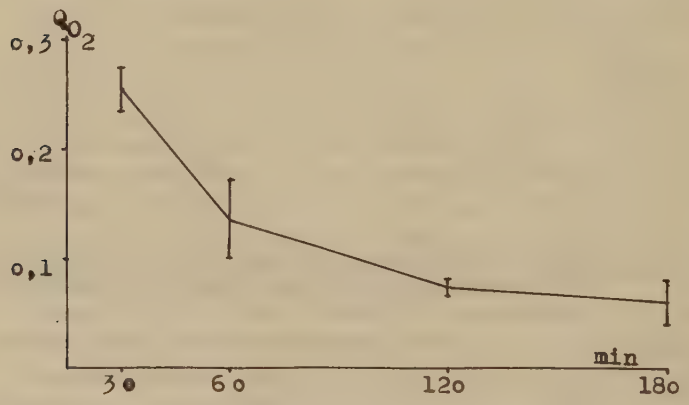
3. Die anaerobe Glykolyse der Meerschweinchen-Epidermis

Suspensionsmedien

Als Maß für die Fähigkeit zur anaeroben Glykolyse gilt die CO_2-Entwicklung bei sauerstofffreier Umgebung. Zu ihrer Bestimmung sind Suspensionslösungen erforderlich, die das Puffersystem HCO_3^- CO_2 enthalten, das mit der Atmosphäre im Gleichgewicht steht. Sonst würde es zur sogenannten Retention durch andere in der Lösung enthaltene Puffersysteme kommen und zu niedrige Werte angezeigt werden (KEIL u.M.[32]).

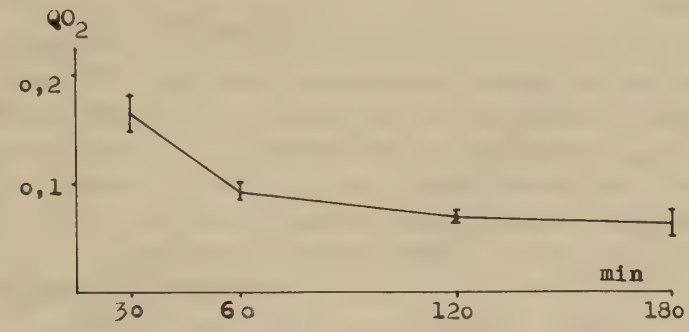
Für Epidermis-Schnitte wurde bei folgenden Inkubationsmedien der Q_{CO_2} bestimmt:

A] Bicarbonat-Ringer-Lösung (Tab.12)
[96 Teile 0,154 mol NaCl; 2 T. 0,154 mol KCl;
2 T. 0,11 mol $CaCl_2$, 20 T. 0,155 mol $NaHCO_3$-Lösung]



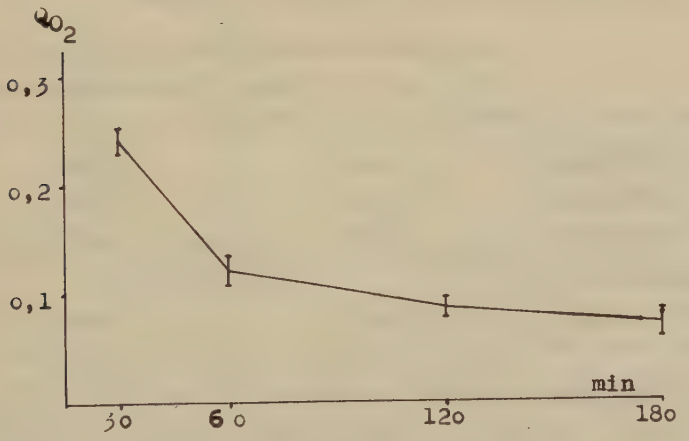
Tab.12 Q_{CO_2} von Epidermisschnitten inkubiert in Bic.-Ringer-Lösung.
[Mittelwerte von 2 Versuchstieren mit insgesamt 8 Ansätzen.]

B] 'Kultur-Medium nach CRUICKSHANK'
[Hier statt des Krebs-Ringer-Phosphat-Puffers wie bei den Atmungsbestimmungen (s.o.) mit einem Na-Bic.-Puffer]



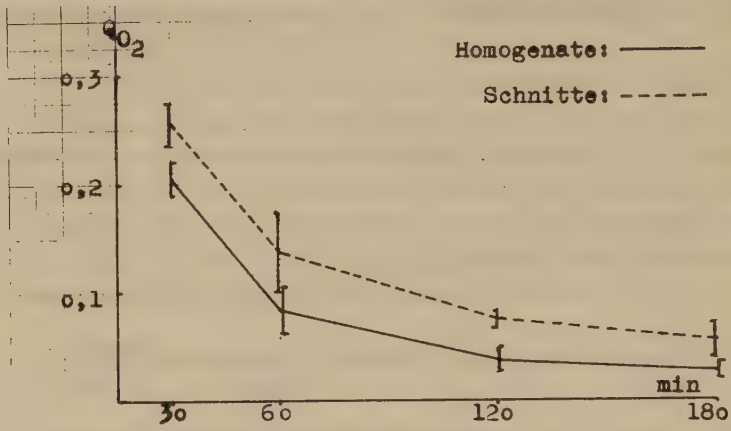
Tab.13 Q_{CO_2} von Epidermisschnitten in 'Kultur-Medium'.
[Mittelwerte von 2 Versuchstieren mit insgesamt 6 Ansätzen]

C] Earle'sche Lösung
[100 Teile NaCl, 6 T. KCl, 3 T. $CaCl_2$, 1,5 T. $MgSo_4$, 2 T. $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 30 T. $NaHCO_3$]



Tab.14 Q_{CO_2} von Epidermisschnitten in Earle'scher Lsg.
[Mittelwerte von 10 Versuchstieren mit insgesamt 30 Ansätzen]

Vergleichsweise wurde der Q_{CO_2} bei einem Epidermishomogenat gemessen. Suspensionsmedium war wieder Bic.-Ringer-Lösung.



Tab.15 Q_{CO_2} von Epidermis homogenisiert und inkubiert in Bic.-Ringer-Lösung.
[Mittelwerte von 5 Tieren mit 15 Versuchsansätzen]

Bei diesen Ergebnissen fällt im Vergleich zu den Atmungsbestimmungen auf, daß die Anfangswerte des Q_{CO_2} zwar recht hoch liegen, dann aber relativ schnell abfallen.

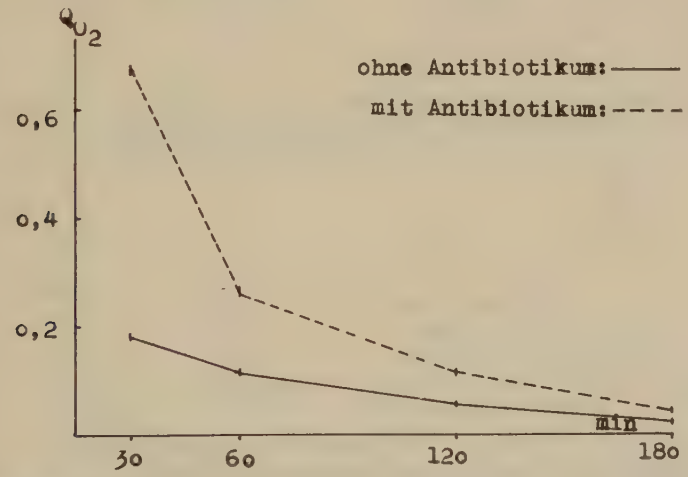
	Durchschnittlicher Q_{CO_2} f. 0 - 30 min	Abklingquote pro h (Versuchsdauer: 3 h)
Schnitte in:		
Bic.-Ringer	0,261	30 %
'Kultur-Med'	0,165	25 %
'Earle'Lsg.	0,242	28 %
Homogenate in:		
Bic.-Ringer	0,205	35 %

Der Vergleich zwischen Epidermisschnitten und Homogenaten, jeweils inkubiert in Bic.-Ringer-Lösung zeigte bei den Homogenaten eindeutig geringere CO_2-Bildungsrate mit steilerem Abfall (Tab.15).

Zusätze

An Zusätzen enthielten alle hier zu der anaeroben Glykolyse verwendeten Versuchslösungen Glucose in einer Konzentration von 0,2 - 0,5 %.

Außerdem wurde auf einen eventuellen Einfluß von Antibiotika auf den Q_{CO_2} geprüft: in geringer Konzentration von 50 µg STREPTOTHENAT® pro ml konnte keine sichere Wirkung festgestellt werden. Bei starker Dosierung allerdings (1 Tropfen SUPRACILLIN® auf 3 ml, entsprechend rd. 1000 I.E. Penicillin und 1 mg Streptothenat pro ml) zeigte sich ein erheblicher Anstieg in der CO_2-Produktion, vor allem in der Anfangssphase.



Tab.16 Steigerung der CO_2-Bildung durch hohe Antibiotikakonzentrationen bei Epidermishomogenaten in Bic.-Ringer-Lsg.

[Mittelwerte von 3 Tieren mit je 9 Ansätzen]

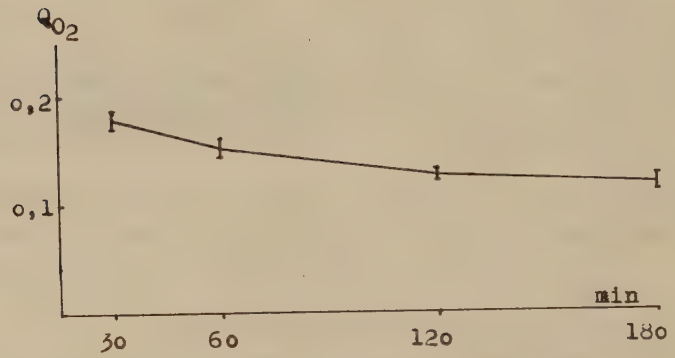
Dieser stimulierenden Wirkung des Antibiotikums bei der anaeroben Glykolyse steht ein depressorischer Einfluß auf die Atmung (s. Tab.9) entgegen. Eine Erklärung für dieses Verhalten kann hier nicht gegeben werden.

B Wirkung verschiedener Zytostatika auf den O_2-Verbrauch der Meerschweinchenepidermis

1. Allgemeines

Bei den folgenden Untersuchungen wurde die Epidermis in Form von Homogenaten verwendet. Als Standardinkubationslösung diente der 0,07 mol Phosphatpuffer nach Sörensen mit folgenden Zusätzen:

Glucose	0,2 %
Streptothenat	50 µg pro ml
ATP	0,8 mg pro ml



Tab.17 Q_{O_2} bei Epidermishomogenaten in o.a. Inkubationsmedium

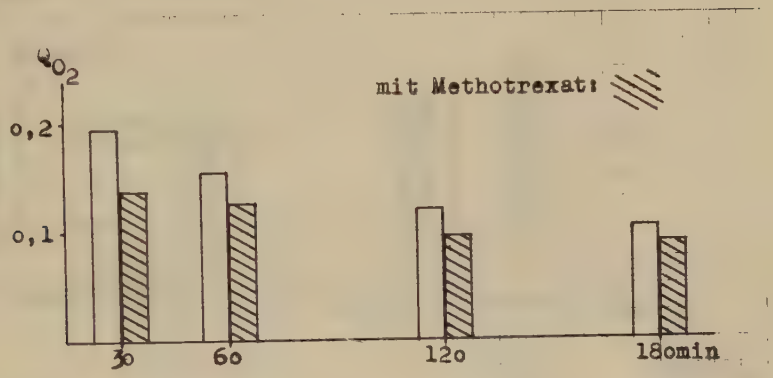
[Mittelwerte von 36 Meerschweinchen mit insgesamt 144 Reaktionsansätzen und die Standardabweichungen s]

Pro Versuchstier wurden jeweils 8 Reaktionsgefäße beschickt, 4 mit Zytostatikum-Zusatz und 4 ohne als Vergleichswerte. Die Zytostatika wurden in 0,9 % NaCl gelöst und in 0,2 ml den Reaktionsgefäßen zugefügt. Um möglichst gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen, brachten wir in die Vergleichsgefäße 0,2 ml einer 0,9 % NaCl ein. Die erste Ablesung erfolgte i.allg.rund 30-40 min nach Einbringen und Einwirken des Zytostatikums (Vorbereitungs-und Temperaturausgleichszeit). Die Ablesungen wurden in der Regel bis zu drei Stunden unternommen, während der ersten Stunde alle 15, im folgenden alle 30 Minuten.

2. METHOTREXAT

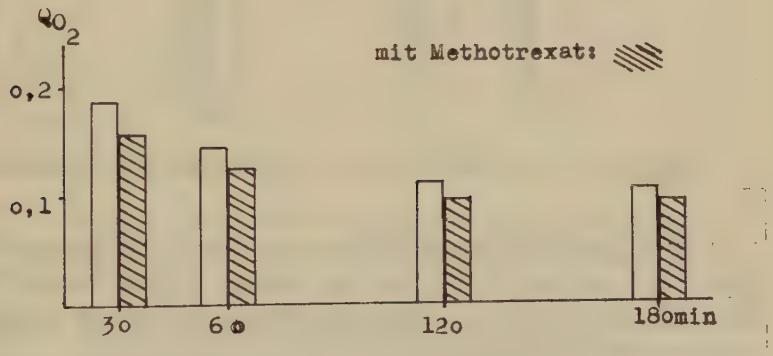
In folgenden Konzentrationen wurden untersucht:

0,01 %



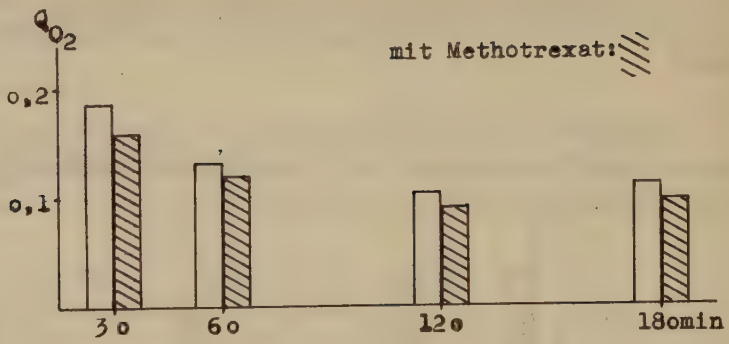
Tab.18 Mittelwerte aus 40 Versuchen an 10 Meerschweinchen und die entsprechenden Vergleichswerte ohne Methotrexat

0,005 %



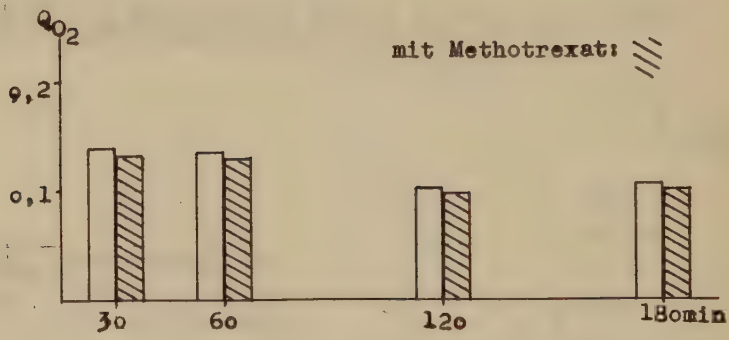
Tab.19 Mittelwerte aus je 24 Versuchen an 6 Meerschweinchen mit Vergleichsreaktionen

0,0025 %



Tab.20 Mittelwerte aus je 12 Versuchen an 3 Meerschweinchen

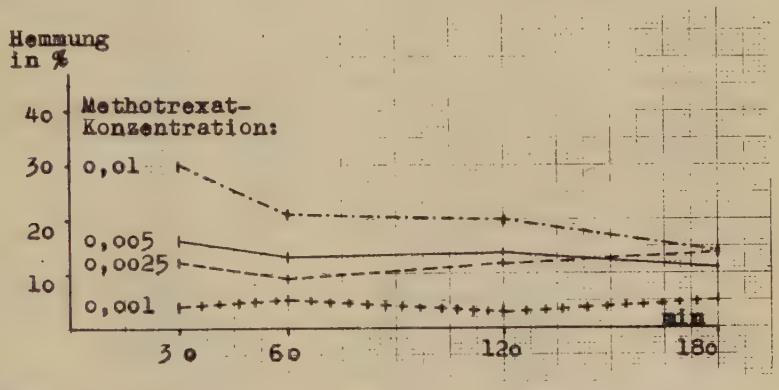
0,001 %



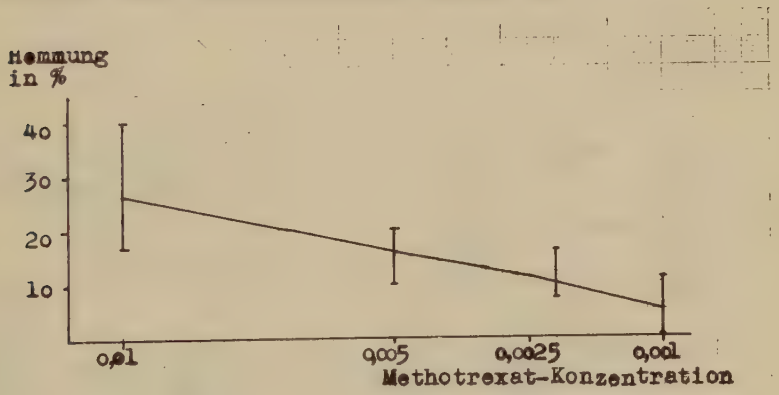
Tab.21 Mittelwerte von je 12 Versuchen an 3 Meerschweinchen

Ziel bei unseren Untersuchungen war, die Grenzkonzentration für eine Beeinflussung der Atmung zu bestimmen. Für Methotrexat wurde in geringeren Konzentrationen keine Wirkung mehr eindeutig meßbar.

Die Einschränkung der Atmungsintensität der Epidermishomogenate durch Methotrexat und deren Konzentrationsabhängigkeit während der ganzen Versuchsdauer zeigen folgende Aufstellungen:



Tab.22 Verminderung im O_2-Verbrauch in Prozent gegenüber den parallellaufenden Vergleichsreaktionen durch Methotrexatzusatz

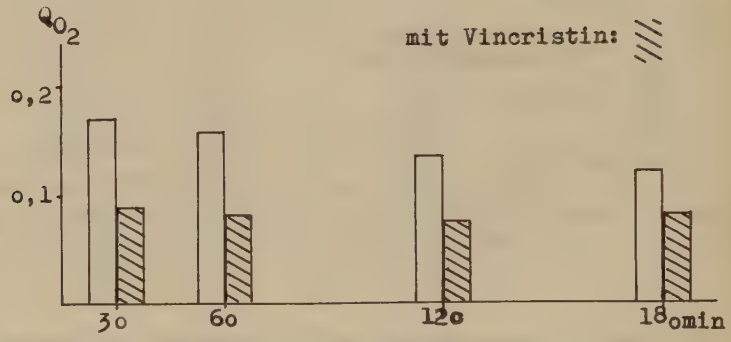


Tab.23 Senkung des O_2-Verbrauchs in den ersten 60 Minuten Versuchsdauer in Abhängigkeit von der Methotrexatkonzentration

3. VINCRISTIN

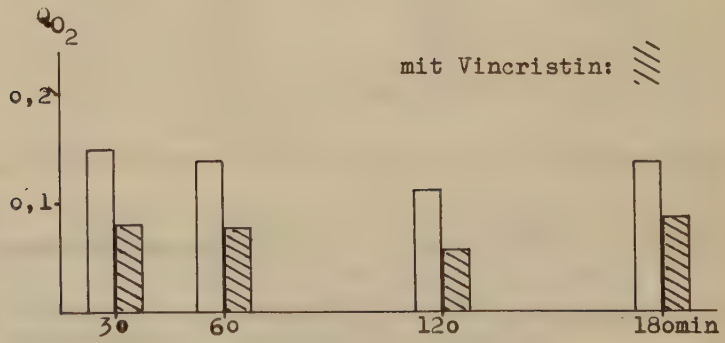
In folgenden Konzentrationen wurde der Atmungsstoffwechsel untersucht:

0,001 %



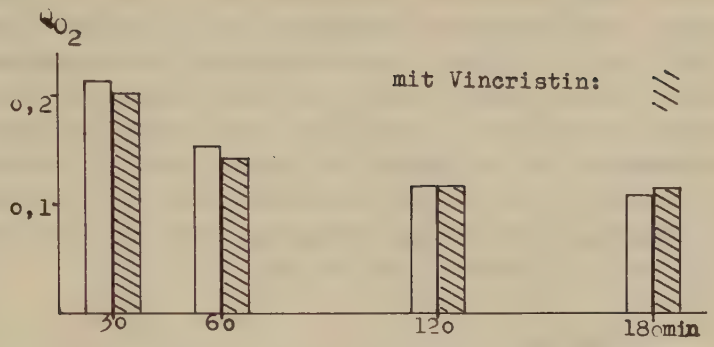
Tab.24 Mittelwerte aus 16 Versuchen an 4 Meerschweinchen verglichen mit parallel durchgeführten Vergleichswerten ohne Vincristin

0,0001 %



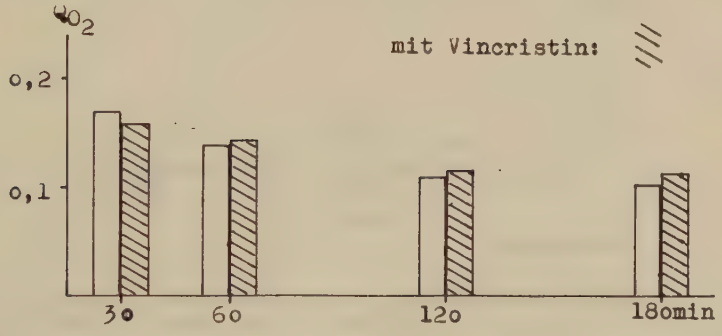
Tab.25 Mittelwerte aus 12 Versuchen an 3 Meerschweinchen mit Vergleichsreaktionen

0,00005 %



Tab.26 Mittelwerte von 12 Versuchen an 3 Meerschweinchen in Vergleich zu parallel durchgeführten Reaktionen ohne Vincristin

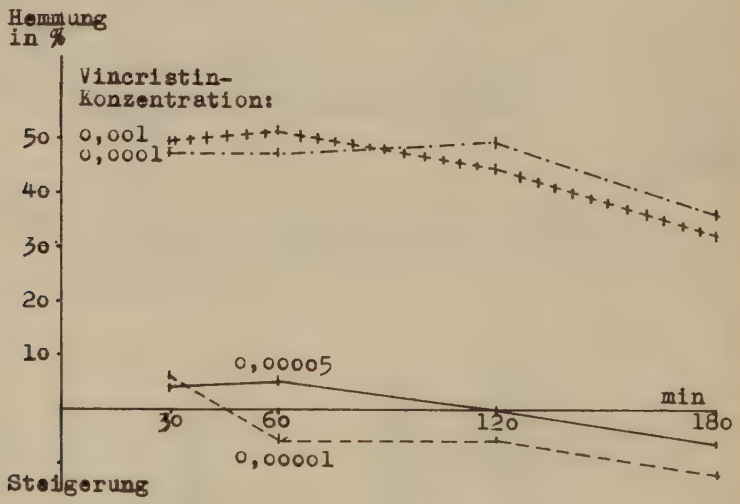
0,00001 %



Tab.27 Mittelwerte von 12 Versuchen an 3 Meerschweinchen mit Vergleichsreaktionen

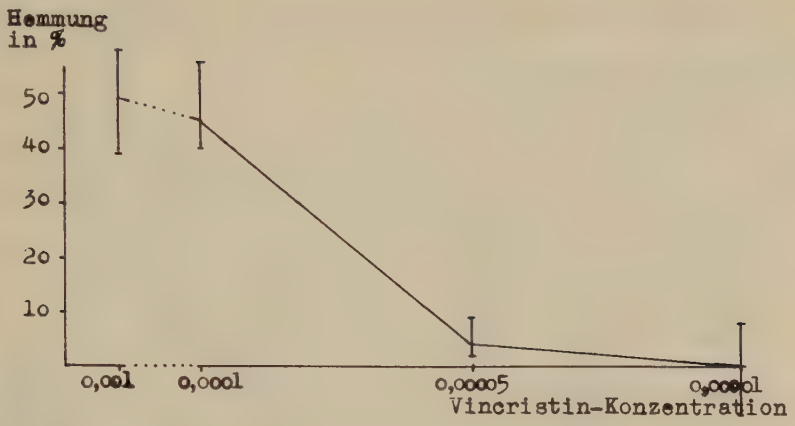
Bei niedrigeren Konzentrationen konnte keine Abweichung gegenüber den unbehandelten Vergleichsreaktionen zumindest für die erste Zeit nach Versuchsbeginn mehr gefunden werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Untersuchungen mit Methotrexat und später auch Trenimon, wo wir innerhalb unserer dreistündigen Versuchsdauer eine ungefähr gleichbleibende, von der Konzentration abhängige atmungshemmende Wirkung fanden, nahm bei den Vincristin-Präparaten der anfangs deutliche depressive Effekt des Vincristin-Zusatzes mit zunehmender Versuchsdauer ab, und es resultierte bei den niedrigeren Konzentrationen später sogar ein höherer O_2-Verbrauch als bei den Präparaten ohne das Zytostatikum. Dies wird besonders in Tab.28 deutlich.



Tab.28 Verminderung im O_2-Verbrauch in Prozent gegenüber den Vergleichsreaktionen in Abhängigkeit von der Zeit

Eine Steigerung der Atmungsintensität durch Vinicristin in der Anfangsphase unserer Versuche wurde auch bei niederen Konzentrationen nicht bemerkt. Neben der Hemmung in höheren Konzentrationen scheint Vincristin noch stabilisierend auf den Atmungsstoffwechsel bei unseren Epidermishomogenaten zu wirken, was in geringeren Abklingquoten zum Ausdruck kommt (s. in Tab.24 - 27).

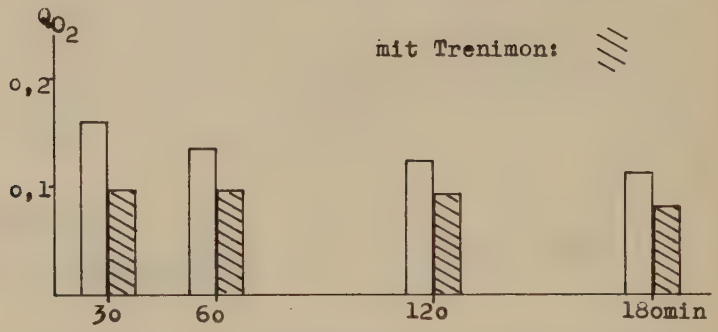


Tab.29 Senkung des O_2-Verbrauchs in den ersten 60 Minuten Versuchsdauer in Abhängigkeit von der Vincristin-Konzentration

4. TRENIMON

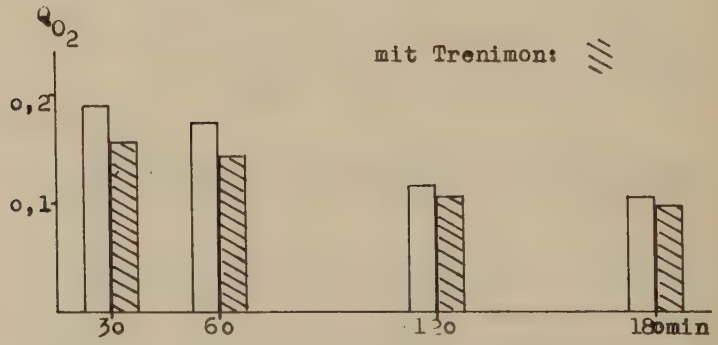
Trenimon kam in folgenden Konzentrationen zur Anwendung:

0,001 %



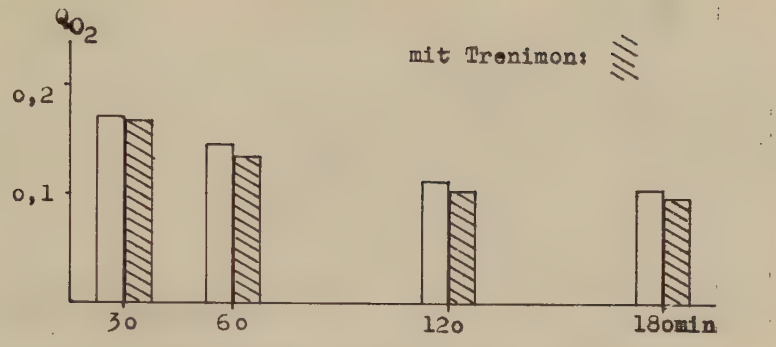
Tab.30 Mittelwerte aus 16 Versuchen an 4 Meerschweinchen verglichen mit parallel durchgeführten Vergleichsreaktionen ohne Trenimon

0,0005 %



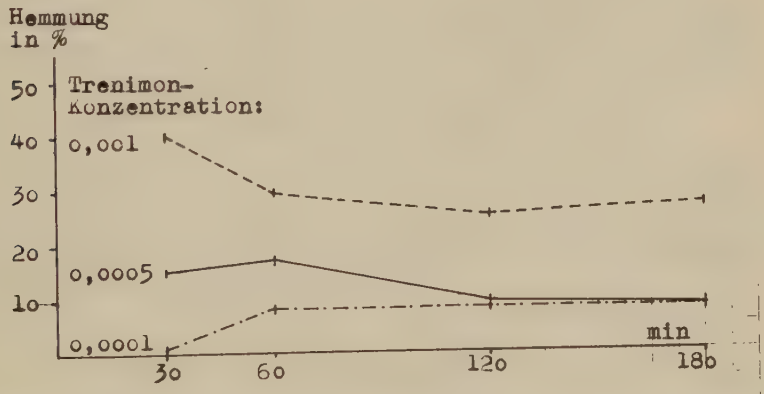
Tab.31 Mittelwerte aus 12 Versuchen an 3 Meerschweinchen mit Vergleichswerten

0,0001 %

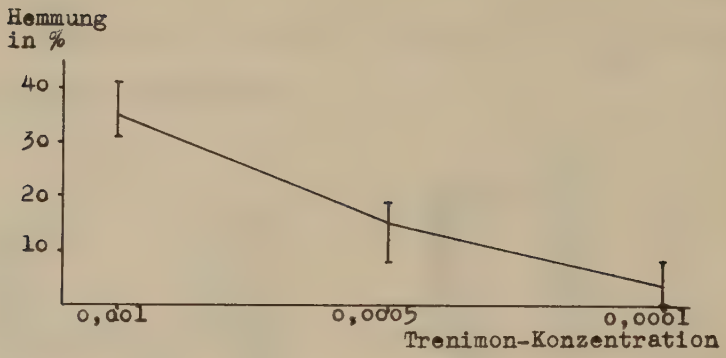


Tab.32 Mittelwerte von 20 Versuchen mit der Epidermis von 5 Meerschweinchen im Vergleich zu parallel durchgeführten Reaktionen ohne Trenimon

In niedrigerer Konzentrierung beeinflußte Trenimon die Epidermisatmung nicht mehr eindeutig negativ.



Tab.33 Verminderung im O_2-Verbrauch für die einzelnen angewendeten Konzentrationen im Laufe der dreistündigen Versuchsdauer in Prozent gegenüber den Vergleichsreaktionen



Tab. 34 Senkung des Sauerstoffverbrauchs in den ersten 60 Minuten Versuchsdauer in Abhängigkeit von der Trenimon-Konzentration

IV. D I S K U S S I O N

Bei Durchsicht und Vergleich bisheriger Untersuchungen zur quantitativen Stoffwechselbestimmung am Hautorgan mit Hilfe der von WARBURG angegebenen und später teilweise weiterentwickelten manometrischen Methode fällt eine große Differenz der jeweils erzielten Resultate auf.

Folgende Zusammenstellung, die keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt, soll das verdeutlichen und gleichzeitig auf einige methodische Besonderheiten hinweisen:

(In einzelnen Fällen wurde der Stoffwechselquotient Q_{O_2} nicht pro mg Trockengewicht, sondern für Feuchtgewicht angegeben. Zugleich war aber in diesen Fällen meist die Relation Trocken- zu Feuchtgewicht ermittelt, so daß eine entsprechende Umrechnung und damit ein Vergleich möglich ist. In einem Falle (FREINKEL[18]) erfolgte die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs pro cm^2 der Hautoberfläche. Auch hier war eine Umrechnung in mm^3 pro mg Trockengewicht möglich, da hier Feuchtgewicht der Hautstückchen und auch das Verhältnis Feucht- zu Trockengewicht angegeben waren.)

Um unsere Ergebnisse aus den Vorversuchen mit diesen Resultaten besser vergleichen zu können, erscheint es nützlich, auch hier eine Umrechnung in das allgemeine Bezugsmaß für den Stoffwechselquotienten Q_{O_2}

$$Q_{O_2}\ (TG): \frac{mm^3\ O_2\text{-Verbrauch}}{mg\ Trockengewicht}$$

an Hand des von uns gefundenen Faktors 4,0 für das Verhältnis Feuchtgewicht zu Trockengewicht vorzunehmen.

Bei Zugrundelegen des Sauerstoffverbrauchs in der ersten Stunde nach Ablesungsbeginn ergeben sich dann für unsere Versuchsreihen folgende mittlere Q_{O_2} (TG):

A T M U N G *)

	Q_{O_2} (TG) für ges. Haut	Q_{O_2} (TG) für Epidermis	Q_{O_2} (TG) für Dermis	Methodische Besonderheiten
Mensch:				
GANS[21] (1923)	0,20 - 2,59			
WOHLGEMUTH u.M.[65] (1926)	0,75	1,8-2,1-3,8	(0,51)	Ringer-Lösung
BUHMANN[8] (1936)	0,5-1,5-2,5	2,6		Ringer-Lösung
AMERSBACH u.M.[3] (1941)	0,63-1,48-2,36			Phosphat-Ringer-Lösung Mikromanometer
BARRON u.M.[5] (1948)	1,59			Phosphat-Ringer-Lösung
STÜTTGEN[55] (1955)	0,8 - 1,0	1,82		Phosphat-Ringer-Lösung
LEIBSOHN u.M.[35] (1958)	0,17-2,03-7,24	1,43-4,53-11,61	0,00-0,49-2,35	Ringer-Lösung, spez. empfindlichere Manometer
FITZGERALD u.M.[17] (1964)	0,9 - 1,5			Tyrode-Lösung, Epidermis-trennung mit Elastase
STÜTTGEN[56] (1965)	0,8	1,5		
Ratte:				
LOEBEL[39] (1925)		neugeboren: 3,54		Ringer-Lösung
THOMPSON[60] (1946)	0,112-0,200 (FG)			
BARRON[5] (1948)	0,81 - 0,94			Phosphat-Ringer-Lösung
GRIESEMER u.M.[25] (1954)		0,150		reiner K-Phosphat-Puffer }
		0,587 ± 0,190		"optimal basal rate mixt." } Homogenate nach POTTER
CRUICKSHANK u.M.[14] (1955)	1,93	3,69	0,90	Spez-Medium m. Serum Epidermislösung mit Trypsin Mikrospirometer
BUHMANN[19] (1957)	(0,64 FG) 2,15			Krebs-Lösung mit Phosphat

[illegible][20] (1957)	(0,64 TG) 2,[illegible] (0,49 FG) 1,65			Krebs-Lösung mit Phosphatpuffer, Bestimmung erfolgte für Feuchtgewicht: Umrechnungsfaktor: 3,36
HEROUX[29] (1959)	0,4 - 0,5			Krebs-Lösung mit Phosphatpuffer
Maus:				
LOEBEL[39] (1925)		neugeboren: 5,62		Ringer-Lösung
BULLOUGH u.M.[9] (1951)	1,8			
CRUICKSHANK u.M.[14] (1955)	2,56	2,59	1,40	Med. n. CRUICKSHANK, Epidermistrennung mit Trypsin, Mikrospirometer
FITZGERALD u.M.[17] (1964)	2,28 (Ohr) 1,24 (Rücken)	4,98 2,13	1,24 1,33	Tyrode-Lsg., Epidermistrennung mit Elastase
Rind:				
GILBERT[22] (1962)	2,5			Phosphat-Krebs-Ringer-Lsg.
SPRINGELL[54] (1966)	0,243-0,257 (FG)			P-Krebs-Ringer-Lsg., Bestimmung erf.f.Feuchtgewicht, kein Umrechnungsfaktor angegeben.
Meerschweinchen:				
GANS[21] (1923)	1,13-1,21			
WOHLGEMUTH u.M.[65] (1926)		3,0		Ringer-Lösung
CRUICKSHANK[12] (1954)	(1,05 FG) 3,69			
14 (1955)	3,60	5,29	2,25	Med. n. CRUICKSHANK, Epidermistrennung m.Trypsin, Mikrospirometer. Tw.Bestimmung pro Feuchtgewicht, Umrechnungsfaktor 3,69
13 (1956)	(1,27 FG) 4,45			
16 (1962)	(0,84 FG) 2,94			
FREINKEL[18] (1962)	(9,76 $\frac{ml}{cm^2}$) 0,75			P-Krebs-Ringer-Lsg.mit Serumzusatz, Bestimmung erfolgte pro Oberfläche, Umrechnung laut angegebener Daten.

*) Bestimmung erfolgte i.allg. für Trockengewicht (TG).
Bestimmungen für Feuchtgewicht mit (FG) gekennzeichnet.

Für Epidermisschnitte:
inkubiert in:

Phosphat-Krebs-Ringer-Lsg. (Tab.3):	0,304
Earle'sches Medium (Tab.4):	0,276
'Kulturmed. n. CRUICKSHANK' (Tab.5):	1,032

Für Epidermishomogenate:
inkubiert in:

Phosphat-Krebs-Ringer-Lsg. (Tab.6):	0,308
K-Phosphat-Puffer (Tab.):	0,184
'Medium f.Gewebebrei n. KEIL' (Tab.7):	0,428
Phosphat-Puffer n.Sörensen (Tab.8):	0,456
mit ATP-Zusatz (Tab.17):	0,608

Ein Vergleich mit der voranstehenden Aufstellung ergibt, daß diese unsere erhaltenen Werte relativ niedrig liegen, insbesondere wenn man nur die bisher an der Meerschweinchenepidermis durchgeführten Untersuchungen von WOHLGEMUTH u.M.[65] (Q_{O_2} (TG): 3,0) und CRUICKSHANK u.M.[14] (Q_{O_2} (TG): 5,29) betrachtet. Beobachtungen an verschiedenen anderen Spezies (z.B. Maus, Ratte, Rind, Mensch), wie sie z.T. CRUICKSHANK u.M.[14] durchführen, zeigen, daß im allgemeinen die Meerschweinchenhaut und -epidermis eine vergleichsweise größere Stoffwechselaktivität bezüglich der Atmung aufzeigt. Allerdings sind die Unterschiede nicht eindeutig und liegen innerhalb der insgesamt gefundenen Schwankungsbreiten.

Zu ähnlichen Größenordnungen wie wir kommt FREINKEL[18], der für die Meerschweinchenhaut, also mit Anteilen der Dermis, einen Q_{O_2}(TG) von ungefähr 0,75 erhält, wobei ein recht aufwendiges Inkubationsmittel mit Serumzusatz verwendet wurde. Hier müßte man natürlich den Anteil der stoffwechselträgeren Dermis berücksichtigen und einen ungefähren Zuschlag von 50 % (STÜTTGEN[55], CRUICKSHANK u.M.[14]) aufschlagen, um zu vergleichbaren Werten für isolierte Epidermis zu gelangen.

Die zum Teil sehr großen Unterschiede in den Ergebnissen der einzelnen Untersucher sind sicher größtenteils in den wechselnden Versuchsbedingungen und abweichender Methodik begründet. Eine besonders wichtige Rolle für die Größe der Atmungsintensität spielt die Wahl des Inkubationsmediums. So zeigte schon bei uns die Meerschweinchenepidermis (Schnitte) in Kultur-Medium n.CRUICKSHANK eine um mehr als 300 % gesteigerte Aktivität gegenüber Earle'schem Medium oder Phosphat-Krebs-Ringer-Lösung. Die große Abhängigkeit vom Inkubationsmedium bestätigen nach vergleichenden Untersuchungen auch z.B. BARRON u.M.[5], KREBS[34], v.GLASENAPP u.M.[23], GRIESEMER u.M.[25] oder GILBERT[22].

Weiterhin können auf die Größe des Stoffwechselquotienten Einfluß nehmen die Zugabe und Konzentration eventueller Zusätze wie zum Beispiel bei unseren Versuchen Glucose, ATP oder Antibiotika.

Während bei uns Glucose in der angewendeten Konzentration von 0.2 % keinen Effekt zeigte (wie z.B. bei FREINKEL[18]), wurden bei BARRON u.M.[5] (0,02 %), FUHRMANN[19] (0,06 %) gesteigerte, bei GILBERT[22] schon in einer Konzentration von 0,02 % an der Rinderepidermis dagegen eindeutig verminderte Atmungsgrößen gemessen, vielleicht Ausdruck des Crabtree-Effektes.

ATP in einer Endkonzentration von 0,0013 mol bewirkte auch bei unseren Untersuchungen (wie bei GRIESEMER u.M.[25]) erhöhte und vor allem wesentlich langsamer absteigende Atmungsintensität (Senkung der Abklingquote von 23 % pro Stunde auf 8 % bei Homogenaten in Sörensen-Puffer (s.o.).

Weitere Stimulation der Atmungsintensität ist möglich nach GRIESEMER u.M.[25], BULLOUGH u.M.[9], CRUICKSHANK u.M.[15] durch Zugabe einiger Zitronensäurezyklus-Substrate.

Nur wenige Untersucher geben genauere Angaben über zeitlichen Verlauf und Veränderungen des Q_{O_2} bei zunehmender Versuchsdauer. BUHMANN[8] fand für die menschliche Haut, inku-

biert in Ringer-Lösung, für die ersten 60 Minuten ziemlich konstante Atmungsgrößen, dann in den nächsten 4 - 5 Stunden starken Abfall bis auf den Nullpunkt. Bei CRUICKSHANK[12] blieben bei seinen Untersuchungen an der Meerschweinchenhaut in seinem speziellen serumhaltigen Medium die Werte für 6 Stunden recht konstant. GILBERT[22] gibt eine ungefähre Abklingquote von 10 - 16 Prozent pro Stunde für die ersten 3 Stunden an (Rinderhaut inkubiert in Phosphat-Krebs-Ringer-Lösung).

Ein weiterer zeitlicher Faktor, der bei der Messung von Atmungsintensitäten zu Bedeutung kommt, liegt nach SPRINGELL[54] in der Vorbereitungszeit von der Entnahme der Gewebsstücke bis zur ersten Versuchsablesung. Er konnte für die Abhängigkeit des Q_{O_2} von der Dauer der Vorbereitungszeit eine mathematische Funktion aufstellen und gibt so für eine theoretische Vorbereitungszeit von nur einer Minute um 64 % höhere Q_{O_2}-Werte als nach 40 Minuten dauernder Verzögerung an.

Derselbe Autor fand auch im Gegensatz zu anderen (z.B. GRIESEMER u.M.[25], KEIL u.M.[32]), die eiskalte Lösungen zur Aufbewahrung und während der Präparation der Epidermisschnitte empfehlen, keinen signifikanten Unterschied gegenüber Präparation bei Raumtemperatur.

Die Stoffwechselaktivität eines Gewebes ist stark altersabhängig. Das Alter der Versuchsobjekte wird sich also erheblich in den ermittelten Q_{O_2}-Werten bemerkbar machen. Das bestätigen BARRON u.M.[5], die für die embryonale Rattendermis einen $Q_{O_{2(TG)}}$ von 2,3 bis 3,6, bei einer sieben Tage alten Dermis einen $Q_{O_{2(TG)}}$ von rund 0,8 bestimmten. Bei menschlicher Haut war die Differenz geringer: $Q_{O_{2(TG)}}$ für fetale Haut 1,81, Erwachsener: 1,51.

Weiterhin kann die Lokalisation der entnommenen Hautstücke auf den Q_{O_2} Einfluß nehmen. So vergleichen z.B. FITZGERALD u.M.[17] Dermis sowie Epidermis aus der Ohrregion und vom Rücken von Mäusen und finden bei annähernd gleicher Aktivität bei der Dermis beider Regionen für die Ohr-Epidermis gegenüber der

Rücken-Epidermis um mehr als 100 % erhöhte Werte. Dagegen ermittelte SPRINGELL[54] bei seinen Versuchen mit Rinderhaut keine signifikante Abhängigkeit des Stoffwechselquotienten von der Körperregion.

Natürlich ist bei Epidermisversuchen die Art der Präparation bedeutsam. Zur Isolierung der Epidermis von der Dermis werden, wie oben schon einmal angedeutet, verschiedene Methoden angegeben, zumeist mechanische Trennungsverfahren wie z.B. nach SCOTT[52]. FITZGERALD u.M.[17] trennen dagegen mit Elastase, CRUICKSHANK u.M.[14] mit Trypsin. Weiterhin ist für die quantitative Bestimmung wichtig, ob das Stratum corneum erhalten bleibt oder nicht (LEIBSOHN u.M.[35]).

Bei der Inkubation von Dermis bzw. Epidermisstückchen empfiehlt CRUICKSHANK[12] die Verwendung von Gaze (TROWELL[61]), um zu gewährleisten, daß die Hautstücke auf der Mediumoberfläche bleiben. Eingetauchte Präparate ergeben nach seinen Angaben um 50 % niedrigere Atmungsquoten wegen verminderter Sauerstoff-Löslichkeit und Diffusionsrate in der Flüssigkeit.

Neben Gewebeschnitten ist die Verwendung von Homogenaten möglich. Bei unseren Untersuchungen verliefen die Atmungsraten bei Epidermisschnitten und Homogenaten in ähnlichen Größenordnungen (s.o.). Auf den Einfluß von Dauer und Art des Homogenisierens auf die Atmungsintensität haben wir ebenfalls oben hingewiesen. Lediglich GRIESEMER u.M.[25] verwenden ebenfalls Epidermis-Homogenate, allerdings von Ratten. Bei reinem K-Phosphat-Puffer wurde ein $Q_{O2(TG)}$ von 0,150 bestimmt, was ungefähr unseren Werten bei gleichem Medium entspricht: 0,184 (umgerechnet für TG, Tab.7). O.a. Autoren verbesserten ihr Medium mit $MgCl_2$, Adenosin-5-Phosphat und Cytochrom c und erreichten so eine Steigerung des $Q_{O_{2(TG)}}$ auf 0,587. Wieder ein Beweis für die große Bedeutung des Inkubationsmediums für die Stoffwechselaktivität bei in-vitro-Versuchen.

Im vorigen ist an Hand von Beispielen dargestellt worden, wie wichtig die Methodik bei der Durchführung der Atmungsbestimmungen mit der WARBURGschen Apparatur ist, und welche Möglichkeiten es gibt, zu z.T. doch recht unterschiedlichen Resultaten und Meßdaten zu gelangen. Hier wären noch einige weitere Gesichtspunkte anzuführen und zu untersuchen, wie die Abhängigkeit des Q_{O_2} von der Menge des Inkubationsmittels und der inkubierten Epidermis, sowie deren quantitatives Verhältnis zueinander (CRUICKSHANK[12]). Das wird zum Teil abhängig sein von der Versuchsapparatur, wie z.B. AMERSBACH u.M.[3], CRUICKSHANK[12] und LEIBSOHN u.M.[35] empfindlichere Manometer und Mikromanometer beschreiben.

Des weiteren werden einige technische Einzelheiten zu beachten sein, wenn man zu optimalen und reproduzierbaren Ergebnissen gelangen will, wie die Höhe der Sauerstoffkonzentration in der Gasphase der Versuchsapparatur und eine maximale CO_2-Absorption. Allerdings werden die hier möglichen Abweichungen bei Epidermispräparaten verglichen mit dickeren und stoffwechselaktiveren Geweben gering bleiben.

Nach SPRINGELL[54] ist sogar die Tageszeit für die Durchführung der Versuche von Einfluß auf die Ergebnisse und die Stärke der Gewebsatmung.

Beachtenswert erscheint auch, ob sich durch eine oberflächliche Reinigung Verfälschungen ergeben, wie sie gerade bei Hautpräparaten erforderlich ist, und wie sie in unterschiedlicher Form durchgeführt wird: pHiso-Hex (FUHRMANN[20]), Äther und Alkohol (BUHMANN[8]), Äther (GILBERT[22]), eiskalte KCl-Lösung (GRIESEMER u.M.[25]). Wir fanden nach vorsichtiger Reinigung durch Betupfen mit Äther keine Abweichungen in der Atmungsintensität gegenüber Vergleichswerten.

Ähnliche Abweichungen in Methode und Ergebnissen wie bei den Untersuchungen zur Hautatmung zeigt eine Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse bei der anaeroben Glykolyse. Außerdem werden in der folgenden Tabelle das jeweilige Verhältnis von anaerober Glykolyse zur Atmung bei den einzelnen Autoren angegeben:

A n a e r o b e G l y k o l y s e

(B e s t i m m u n g e n f ü r T r o c k e n g e w i c h t)

	$Q^{N_2}_{CO_2}$ für ges.Haut	$Q^{N_2}_{CO_2}:Q_{O_2}$	$Q^{N_2}_{CO_2}$ für Epidermis	$Q^{N_2}_{CO_2}:Q_{O_2}$	$Q^{N_2}_{CO_2}$ für Dermis	$Q^{N_2}_{CO_2}:Q_{O_2}$
Mensch:						
WOHLGEMUTH u.M.[65] (1926)			3,5-6,0-11,6	2,9		
BUHMANN[8] (1936)	5,0	3,3	9,5	3,7		
BARRON u.M.[5] (1948)	3,66	2,4				
STUTTGEN[55] (1955)	2,0 -3,0	2,8	5,0	2,8		
56 (1965)			4,5	3,0	3,0	4,0
Ratte:						
BARRON u.M.[5] (1948)	1,28	1,6				
LOEBEL[39] (1925)			neugeb. 7,08	2,0		
FUHRMANN[19] (1957)			(0,82 FG)2,76	1,3		
Maus:						
LOEBEL[39] (1925)			neugeb. 5,28	0,94		
Meerschweinchen:						
WOHLGEMUTH u.M.[65] (1926)			7,2	2,4		

Sämtliche Voruntersucher arbeiteten nur mit Gewebeschnitten und die meisten mit Bicarbonat-Ringer-Lösung als Inkubationsmedium. Ein Vergleich mit unseren Ergebnissen - wiederum umgerechnet auf das Trockengewicht - zeigt, daß meist wesentlich höhere Raten für die anaerobe Glykolyse gefunden wurden. Allerdings sind dies z.T. Ergebnisse schon sehr alter Untersuchungen.

$Q^{N_2}_{CO_2}$ aus unseren Versuchsreihen nach Umrechnung auf Trockengewicht (mal 4,0) und bei Berücksichtigung der CO_2-Bildung in den ersten 30 Minuten:

Für Epidermisschnitte
inkubiert in:

Bicarbonat-Ringer-Lsg.	(Tab.12) :	1,044
Kult.Med.n.CRUICKSHANK mit Bic.-Puffer	(Tab.13) :	0,660
Earle'sche Lösung	(Tab.14) :	0,968

Für Epidermishomogenate
inkubiert in:

Bicarbonat-Ringer-Lsg.	(Tab.15) :	0,820

Auffällig war noch bei unseren Versuchen der sehr starke und rasche Abfall der CO_2- bzw. Milchsäureproduktion als Zeichen der anaeroben Glykolyse. Das drückt sich besonders in den hohen Abklingquoten (28 - 35 % pro Stunde) aus. Diesbezügliche Angaben anderer Autoren stehen nicht zur Verfügung.

Wenn auch die Werte für die anaerobe Glykolyse, wenn wir von den Ergebnissen in 'Kulturmedium nach CRUICKSHANK' absehen, im allgemeinen höher als bei der Atmung liegen, erscheint es nicht gerechtfertigt, hier einen Quotienten zu ziehen, da durch den zwangsläufig veränderten Pufferzusatz (bei anaerober Glykolyse Bicarbonat-haltiger Puffer notwendig) ungleiche Voraussetzungen bestehen. Wie groß der Einfluß der Zusammensetzung des Inkubationsmittels auf die Stoffwechselrate ist, wurde immer wieder geschildert (s.o.).

Die starke Abhängigkeit von äußeren Faktoren bei der Arbeit mit Hautpräparaten zur Bestimmung der Aktivitäten des Atmungs- und Glykolyse-Stoffwechsels mit der manometrischen Methode läßt nur sehr bedingt Rückschlüsse von den erhaltenen Meßdaten auf die wahre Stoffwechselkapazität dieses Gewebes in vitro zu. Noch problematischer sind Folgerungen auf den in-vivo-Stoffwechsel.

Wenn es auch nicht gerechtfertigt erscheint, mit Hilfe der WARBURG-Methode Absolutwerte für eine Gewebsatmung aufzustellen, so erscheint sie doch bei hinreichender Standardisierung geeignet, als grobe Suchmethode relative Stoffwechselveränderungen unter wechselnden Bedingungen zu erfassen, wie z.B. in unserem Falle, wo es darum geht, die Einwirkung verschiedener Zytostatika auf den Epidermisstoffwechsel zu prüfen.

Die von uns untersuchten Zytostatika Methotrexat, Vincristin und Trenimon, Angehörige verschiedener Stoffgruppen und von unterschiedlicher, zum Teil noch unbekannter Wirkungsweise, zeigten bei unseren Versuchsreihen sämtlich einen mehr oder weniger großen Einfluß auf den Energiestoffwechsel, und zwar alle geprüften Substanzen im Sinne einer Atmungshemmung. Das gilt zumindest für die Phase unmittelbar nach Versuchsbeginn. Folgende Grenzkonzentrationen, bei denen noch eine Atmungshemmung gemessen werden konnte, wurden ermittelt:

Methotrexat : 10 mg/l
Vincristin : 0,1 - 0,5 mg/l
Trenimon : 1 mg/l

Über Vincristin und die Alkaloide sowie über die Antimetaboliten bestehen bisher wenig vergleichbare, zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. JOHNSON u.M.[31] fanden bei ihren in-vitro-Untersuchungen mit Tumor- und normalem Milzgewebe weder Hemmung noch Stimulation der Atmung durch Alkaloide. Sie berichten aber von abweichenden Resultaten anderer Untersucher (HUNTER).
Die Dosis für eine Hinderung des Zellwachstums haben ADAMSON u.M.[2] mit 0,01 mg/l Medium bestimmt. JOHNSON u.M.[31] berichten über eine Depression der Atmung erst bei einer Konzentration von über 0,05 mg/ml

Zu den Antimetaboliten fand LEONHARDI[37] nach Zugabe von Aminopterin keine Wirkung auf den psoriatisch veränderten Atmungsstoffwechsel der Haut. Mit einem Purin-Antagonisten (6-Mercaptopurin) arbeitete PÜTTER[45] und ermittelte an Ehrlich-Mäuse-Karzinom-Zellkulturen nur geringe oder in größeren Konzentrationen auftretende Hemmwirkungen.

Lediglich die alkylierenden Substanzen, N-Lostverbindungen und Äthylenimine sind bisher auf ihre Einwirkung in den Energiestoffwechsel ausführlicher untersucht worden (PÜTTER[45], GRUNICKE u.M.[26], CHROMETZKA u.M.[11]). Teilweise wurde hier auch schon versucht, einen Angriffspunkt zu lokalisieren.

Unsere Epidermispräparate zeigten sich gegenüber Trenimon empfindlicher, als nach den Angaben von PÜTTER zu vermuten gewesen wäre, indem eine Hemmung des Atmungsstoffwechsels schon bei einer Konzentration von 1 mg/l deutlich wurde. PÜTTER u.M.[48] geben eine eindeutige Hemmung von Atmung und Glykolyse an Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in einer Trenimon-Konzentration von 10^{-5} mol, etwa 2,3 mg/l an und nehmen für normales Gewebe eine Beeinflussung des Energiestoffwechsels erst bei noch höheren Konzentrationen an.

Das bei unseren Versuchen gefundene rasche Wirksamwerden der entsprechenden Zytostatika-Zusätze spricht dafür, daß neben dem eine Zellvermehrung hemmenden Effekt mit RNS-Synthese- und Mitosestörung ein Eingriff in andere Zellmechanismen wie hier den Energiestoffwechsel wirksam wird, der nicht unbedingt mit der zytostatischen Aktivität der entsprechenden Substanz zusammenhängen muß. Der Wirkungsmodus kann dabei für die untersuchten Stoffgruppen durchaus gänzlich unterschiedlich sein, woraufhin schon die abweichende Verlaufskurve bei den Versuchen mit Vincristin hindeuten, wo wir bei den niederen Konzentrationen nachlassende Hemmwirkung mit Steigerung der Oxydationsraten gegenüber den Vergleichswerten fanden.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Mit Hilfe der von O.v. WARBURG angegebenen manometrischen Methode wurden Atmung und anaerobe Glykolyse der Epidermis aus der Rückenregion von jungen männlichen Albinomeerschweinchen geprüft.

Die Untersuchungen erfolgten für einen laufenden Zeitraum von 3 Stunden. Die Bestimmung der Stoffwechselgrößen wurde pro mg Feuchtgewicht vorgenommen. Das Verhältnis Feuchtgewicht zu Trockengewicht betrug laut unserer Untersuchungen 4,0 zu 1.

Die Epidermis wurde - nach Epilation und mechanischer Trennung von der Dermis - teils in Form von Gewebeschnitten, teils als Homogenate den Untersuchungen zugeführt.

Im einzelnen ergaben sich folgende Befunde:

1. Der Stoffwechselquotient Q_{O_2} erwies sich bei den Epidermishomogenaten abhängig von Art und Intensität der Homogenisation.
2. Die Höhe und die Stabilität des Q_{O_2} wird sowohl bei Epidermisschnitten wie bei Homogenaten erheblich von den angewendeten Inkubationsmedien beeinflußt, wobei für die Schnitte Inkubationen in Phosphat-Krebs-Ringer-Lösung, Earle'schem Medium und 'Kulturmedium nach CRUICKSHANK', für Homogenate Inkubationen in P-Krebs-Ringer-Lösung, 'Medium für Gewebebrei nach KEIL', K-Phosphatpuffer und Phosphatpuffer nach Sörensen untersucht wurden. Zwischen den Epidermiszubereitungen als Gewebeschnitte und Homogenate zeigte sich hinsichtlich Höhe des Stoffwechselquotienten kein eindeutiger Unterschied. Die Q_{O_2}-Werte betrugen von optimal 0,258 (Feuchtgewicht) bei Inkubation in 'Kulturmedium nach CRUICKSHANK' bis lediglich 0,092 bei Inkubation in reinem K-Phosphat-Puffer.

Der Aktivitätsverlust betrug während der Versuchszeit von 3 Stunden je nach Art der Inkubation 12 - 26 % pro Stunde.

3. Durch Zusatz von ATP in der Konzentration von 0,8 mg/ml ließ sich eine deutliche Steigerung der Atmungsaktivität gegenüber Vergleichswerten feststellen, die mit zunehmender Versuchsdauer noch erheblicher wurde. Zugaben von Glucose in der Konzentration von 0,2 % und von Antibiotika (50 µg/ml STREPTOTHENAT®) ergaben keine Abweichungen.

4. Auch das Ausmaß der anaeroben Glykolyse wurde weitgehend bestimmt vom angewendeten Inkubationsmedium (Gewebsschnitte in Bic.-Ringer-Lsg., 'Kulturmedium n.CRUICKSHANK' mit Bic.-Puffer, Earle'sche Lösung und Homogenate in Bic.-Ringer). Anfängliche $Q_{CO_2}^{N_2}$ (Feuchtgewicht)-Werte von 0,165 - 0,261 wurden gemessen bei relativ starker Abklingquote von 25 - 35 % pro h.

5. Auf die besondere Bedeutung von Methodik und Versuchsanordnung beim Arbeiten am Hautorgan mit Hilfe des manometrischen Verfahrens wird an Hand von Beispielen ausführlich hingewiesen.

Im weiteren wurde der Einfluß verschiedener Zytostatika (Methotrexat, Vincristin, Trenimon) auf den Atmungsstoffwechsel von Epidermishomogenaten untersucht. Bei Methotrexat und Trenimon fanden sich während der dreistündigen Versuchsdauer eine ungefähr gleichbleibende, konzentrationsabhängige Einschränkung der Atmungsaktivität bei einer Grenzkonzentration von für Methotrexat 10 mg/l und für Trenimon 1 mg/l. Für Vincristin wurde eine in höheren Konzentrationen (1 - 10 mg/l) sehr starke Atmungshemmung von um 50 % registriert, die bei stärkerer Verdünnung (0,5 - 0,1 mg/l) nur noch anfangs und in geringer Weise auftrat. Bei zunehmender Versuchsdauer resultierte hier sogar gegenüber den Präparaten ohne Zytostatika ein zunehmender Sauerstoffverbrauch.

VI. LITERATURNACHWEIS

1. Adams, P.D.:
The oxygen uptake and composition of the skin of rats in vit. G (B_2) deficiency.
J. Biol. Chem. 116, 641 (1936)

2. Adamson, R.H., R.L. Dixon, M. Ben, L. Crews, S.B. Shohet und D.P. Rall:
Some pharmacologic properties of Vincristine.
Arch. Int. Pharmocodyn. 157, 299 (1965)

3. Amersbach, J.C., L.G. Nuttini und E.S. Cooke:
Skin respiration as a dermatologic tool.
Arch. Derm. (Chicago) 43, 949 (1941)

4. Bamann, E und K. Myrbäck:
Die Methoden der Fermentforschung.
Thieme, Leipzig 1941

5. Barron, E.S.G., J. Meyer und Z.B. Miller:
The metabolism of skin, effect of vesciant agents.
J. Invest. Derm. 11, 97 (1948)

6. Bergmeyer, H.-U.:
Methoden der enzymatischen Analyse.
Chemie, Weinheim (Bergstr.) 1962

7. Braun-Falco, O.:
Die Histochemie der Haut.
in: Gottron, H.A. und W. Schönfeld:
Dermatologie und Venerologie.
Thieme, Stuttgart 1961

8. Buhmann, A.:
Atmung und Glykolyse in normaler und pathologisch veränderter Haut, insbesondere mit Hinblick auf Psoriasis.
Biochem. Ztschr. 287, 145 (1936)

9. Bullough, W.S. und M. Johnson:
The energy relations of mitotic activity in adult mouse epidermis.
Proc. Roy. Soc. Lond. B 138, 562 (1951)

10. Cardinali, G., G.Cardinali und M.A. Enein:
Studies on the antimitotic activity of leucocristine (Vincristine).
Blood 21, 102 (1963)

11. Chrometzka, K., A. Reinicke und W. Lührs:
Untersuchungen über das Verhalten von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen unter Einwirkung von Fruktose und nach Zusatz von Zytostatika und Fruktose-1,6-Diphosphatase.
Med. Klin. 60, 1154 (1965)

12. Cruickshank, C.N.D.:
Continuous observation of the respiration of skin in vitro.
Exp. Cell Res. 7, 374 (1954)

13. Cruickshank, C.N.D. und M.D. Trotter:
The oxygen uptake, glucose utilization and lactic acid production of guinea-pig skin in relation to oxygen tension.
Biochem. J. 62, 57 (1956)

14. Cruickshank, C.N.D. und J.R. Cooper:
The contribution of epidermis and dermis to the respiration of the ear skin of the guinea-pig, rat and mouse.
Exp. Cell Res. 9, 363 (1955)

15. Cruickshank, C.N.D., M.D. Trotter und J.R. Cooper:
Studies on the carbohydrate metabolism of skin.
Biochem. J. 66, 285 (1957)

16. Cruickshank, C.N.D., M.D. Trotter und J.R.Cooper:
A study of available substrates for the endogenous respiration of skin in vitro.
J. Invest. Derm. 39, 175 (1962)

17. Fitzgerald, L.R. und M. Klein:
Respiration of mouse skin and of dermis and epidermis following separation with elastase.
J. Invest. Derm. 42, 209 (1964)

18. Freinkel, R.K.:
Effect of thyroxine administration on the metabolism of guinea-pig skin.
J. Invest. Derm. 38, 31 (1962)

19. Fuhrmann, F.A.:
Metabolism of excised rat skin in hypertonic media.
J. Gen. Physiol. 40, 351 (1957)

20. Fuhrmann, F.A. und G.J. Fuhrmann:
Metabolism of rat skin in vitro with special reference to effect of body size on tissue metabolism.
J. Appl. Physiol. 10, 219 (1957)

21. Gans, O.:
Über die Gewebsatmung in der gesunden und kranken Haut.
Dtsch. med. Wschr. 49, 16 (1923)

22. Gilbert, D.:
Glycolysis and respiration in cattle skin.
J. Invest. Derm. 38, 93 (1962)

23. Glasenapp, v., I. und G. Leonhardi:
Die biologische Oxydation in der menschlichen Haut.
Arch. klin. exp. Derm. 196, 319 (1953)

24. Göber, B.:
Krebschemotherapeutica.
Pharmazie 21, 325 (1966)

25. Griesemer, R.D. und E. Gould:
A method for the study of the intermediary carbohydrate metabolism of epidermis.
J. Invest. Derm. 22, 299 (1954)

26. Grunicke, H., E. Richter, M. Hinz, M. Liersch, B. Puschendorf und H. Holzer:
Über den Einfluß von Trenimon auf den NAD-Stoffwechsel von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Biochem. Z. 346, 60 (1966)

27. Hastings, A.B., J. Muus und O.A. Bessey:
Tissue metabolism in vitamin deficiencies.
J. Biol. Chem. 129, 295 (1939)

28. Heilmeyer, L.:
Der gegenwärtige Stand der Chemotherapie der Neoplasien.
Med. Klin. 60, 649 (1965)

29. Heroux, O.:
Comparison between seasonal and thermal acclimation in white rats.
Canadian J. Bioch. 37, 1247 (1959)

30. Hinsberg, K. und K. Lang:
Medizinische Chemie für den klinischen und theoretischen Gebrauch.
Urban und Schwarzenberg; München,Berlin,Wien 1957

31. Johnson, I.S., J.G. Armstrong, M. Gorman und J.P.Burnett jr.:
The vinca alkaloids: A new class of oncolytic agents.
Cancer Res. 23, 1390 (1963)

32. Keil, B. und Z. Sormova:
Laboratoriumstechnik für Biochemiker.
Akademische Verlagsges., Leipzig 1965

33. Kludas, M. und W. Eschbach:
Steigerung der Atmung und Glykolyse menschlicher Epidermis durch unmittelbare Wirkung von Placenta-Salbe.
Hautarzt 11, 515 (1960)

34. Krebs, H.A.:
Body size and tissue respiration.
Biochem. et biophysic. Acta 4, 249 (1950)

35. Leibsohn, E., B. Appel, W.C. Ullrick und J.Mauray:
Respiration of human skin.
J. Invest. Derm. 30, 1 (1958)

36. Leonhardi, G.:
Stand der Fermentforschung auf dem Gebiete der Dermatologie.
Arch. klin. exp. Derm. 211, 75 (1960)

37. Leonhardi, G.:
Die Beeinflussung von Atmung und Glykolyse der Haut durch verschiedene Pharmaka.
Arch. klin. exp. Derm. 213, 839 (1961)

38. Liss, E. und G. Palme:
DPN-Gehalt, anaerobe Glykolyse und DNS-Synthese von Ascites-Tumorzellen unter dem Einfluß von Trenimon.
Naturwiss. 50, 672 (1963)

39. Loebel, R.O.:
Beitrag zur Atmung und Glykolyse tierischer Gewebe.
Biochem. Ztschr. 161, 219 (1925)

40. Mittenecker,E.:
Planung und statistische Auswertung von Experimenten.
Deuticke; Wien 1963

41. Nevinny, H.B.:
Chemotherapie des Krebses mit Antimetaboliten.
Monatskurse für ärztliche Fortbildung, 16, 240 (1966)

42. Oberste-Lehn, H. und F.W. Wiemann:
Die Meerschweinchenhaut als dermatologisches Testobjekt.
Arch. klin. exp. Derm. 209, 539 (1959)

43. Palmer, C.G. und A.K. Warren:
The cytological action of alkaloids of Vinca Rosea.
Proc. Am. Assn. Cancer Res. 3, 350 (1952)

44. Presnell, A.K.:
The relation of vitamin D to skin respiration.
J. Biol. Chem. 121, 5 (1937)

45. Pütter, J.:
Stoffwechselwirkungen von Äthyleniminochinonen.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 10, 8 (1960)

46. Pütter, J.:
Die Beeinflussung des Energiehaushaltes der Tumorzelle durch Trenimon.
Krebsforschung und Krebsbekämpfung 4, 188 (1961)

47. Pütter, J.:
Die Einwirkung des Trenimons auf Energiestoffwechsel und Wachstum der Tumorzellen.
Med. Welt 42, 2238 (1966)

48. Pütter, J. und R. Bierling:
Beeinflussung des Energiestoffwechsels und der Wachstumshemmung der Tumorzellen durch Trenimon.
Med. u. Chem. 7, 679 (1963)

49. Rassner, G.:
Zur enzymatischen Organisation des energieliefernden Stoffwechsels der normalen Meerschweinchenhaut.
Arch. klin. exp. Derm. 222, 383 (1965)

50. Rees, B.R.:
Orale Methotrexat-Behandlung der Psoriasis.
Fortschr. Med. 83, 732 (1965)

51. Salfeld, K.:
Zur Frage des energieliefernden Stoffwechsels und des Aminosäuremetabolismus der alternden Haut.
Arch. klin. exp. Derm. 225, 82 (1966)

52. Schaaf, F.:
Die Meerschweinchenhaut als dermatologisches Testobjekt.
Arch. klin. exp. Derm. 210, 327 (1960)

53. Scott, E.J. van:
Mechanical separation of the epidermis from the corium.
J. Invest. Derm. 18, 377 (1952)

54. Springell, P.H.:
Some factors influencing respiration of cattle skin slices.
J. Invest. Derm. 46, 366 (1966)

55. Stüttgen, G.:
Zur Atmung und Glykolyse der normalen und krankhaft veränderten Haut.
Arch. klin. exp. Derm. 201, 507 (1955)

56. Stüttgen, G.:
Die normale und pathologische Physiologie der Haut.
Gustav Fischer; Stuttgart 1965

57. Stüttgen, G. und K.J. Ebschner:
Sexualhormone und Hautatmung.
Arch. Derm. Syph. (Berlin) 198, 375 (1950)

58. Sure, B. und J.B. Dewitt:
The oxygen uptake of tissues in vitamin deficiencies.
J. Biol. Chem. 126, 287 (1938)

59. Svoboda, G.H.:
The current status of research on the alkaloids of Vinca Rosea.
Lloydia 25, 334 (1962)

60. Thompson, R.H.S.:
The effect of arsenical vesicants on the respiration of skin.
Biochem. J. 40, 525 (1946)

61. Trowell, G.:
A modified technique for organ culture in vitro.
Exp.Cell Res. 6, 246 (1954)

62. Warburg, O. von:
Über den Stoffwechsel der Tumoren.
Springer; Berlin 1926

63. Wehrmann, R.:
Die Enzyme (Fermente).
in: Gottron, H.A. und W. Schönfeld:
Dermatologie und Venerologie.
Thieme; Stuttgart 1963

64. Willmer, E.N.:
Cells and tissues in culture, methods, biology, and physiology.
Academic Press; London and New York 1965

65. Wohlgemuth, J. und E. Klopstock:
Atmung und Glykolyse der Haut und ihre Beeinflussung durch Hormone.
Biochem. Ztschr. 175, 202 (1926)

Herrn Prof. Dr. med. C. G. Schirren danke ich für die Übernahme der Arbeit sowie Herrn Priv.Doz. Dr.Dr. K. Salfeld für die Überlassung des Themas und die wertvolle Anleitung und die Ratschläge bei der Durchführung.

Lebenslauf

Am 20. 6. 1941 wurde ich, Gerhard Blonski, als ältester Sohn des damaligen Heeresoberlehrer Gerhard Blonski und seiner Ehefrau Gertraud, geb. Skrzyppek, in Lötzen (Ostpreußen) geboren.

Nach den vier Grundschuljahren an der Volksschule Hamberge (Schleswig-Holstein) besuchte ich ab 1951 das altsprachliche Gymnasium in Lübeck. Dort erlangte ich auch am 2. 3. 1960 das Reifezeugnis.

Anschließend meldete ich mich vorzeitig für zwei Jahre zur Ableistung meines Wehrdienstes zur Bundeswehr, wo ich die Laufbahn eines Reserveoffiziers einschlug.

1962 begann mein Medizinstudium an der Philipps-Universität in Marburg. Hier bestand ich auch 1963 die naturwissenschaftliche und 1964 die ärztliche Vorprüfung und am 20.12.1967 das medizinische Staatsexamen.

Darauf war ich als Medizinalassistent sechs Monate lang an der Dermatologischen Klinik in Minden, später am Bundeswehr-Lazarett Detmold auf der Medizinischen Abteilung tätig und arbeite zur Zeit am Kreiskrankenhaus in Ziegenhain.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Brück, Buchholz, Bücher, Dimroth, Drawert, Exner, Gedigk, Hamm, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Jacob, Karlson, Knauff, Lang, Linneweh, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes, du Mesnil de Rochemont, Neubauer, Niessing, Petry, Rodeck, Rohen, Salfeld, Schleyer, Schmid, Schrappe, Schultze, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Spiegelberg, Straub, Streicher, Walcher, Wendt, Würterle.